

Université de Montréal

**Le rôle des vésicules extracellulaires dans la dysfonction lymphatique liée à
l'athérosclérose**

Maya Farhat

Département des sciences biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en Sciences (M.Sc.) Biomédicales, Option Médecine expérimentale

Décembre 2019

© Maya Farhat, 2019

Université de Montréal

Département des Sciences biomédicales, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

**Le rôle des vésicules extracellulaires dans la dysfonction lymphatique liée à
l'athérosclérose**

Présenté par

Maya Farhat

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Guy Rousseau

Président-rapporteur

Catherine Martel

Directrice de recherche

Stéphanie Lehoux

Membre du jury

Résumé

Toutes les cellules libèrent plusieurs types de vésicules extracellulaires (VEs) qui transportent protéines, lipides et acides nucléiques. Ces vésicules de petite taille se retrouvent dans tous les fluides biologiques tel que le sang et la lymphe et interagissent avec les cellules environnantes. Le système lymphatique constitue une voie de prédilection pour la mobilisation des accepteurs de cholestérol à partir de la paroi artérielle. Nous avons démontré dans un modèle murin qu'une dysfonction lymphatique précède la formation de la plaque d'athérome et que cette dysfonction touche a priori la capacité de contraction des vaisseaux collecteurs. À la base de toutes ces observations, nous avons émis l'hypothèse que les VEs contribuent à la dysfonction lymphatique liée à l'athérosclérose. Pour répondre à ceci, nous avons mis en place un projet translationnel composé de deux groupes de sujets sains, sans maladie cardiovasculaire, qui se distinguent par la présence d'antécédents familiaux d'accidents cardiovasculaires prématurés chez un parent du premier degré. Nous avons quantifié plusieurs sous-types d'intérêt de VEs en circulation à partir du plasma exempt de plaquettes, par cytométrie en flux ultraspécialisés dans la détection de petites particules (> 100 nm) combiné à d'autres techniques complémentaires standardisées. Ensuite, nous avons évalué la fonction lymphatique grâce à l'imagerie par proche infrarouge après injection du vert indocyanine (ICG). Nos résultats préliminaires sont prometteurs quant aux rôles des VEs et de la dysfonction lymphatique dans le développement de l'athérosclérose et corroborent avec nos observations faites chez la souris. Les sujets avec antécédents familiaux de maladie cardiovasculaire (MCV) présentent des signes de dysfonction lymphatique avant même l'apparition de plaques d'athérome subcliniques. La réponse mécano-sensible de leurs vaisseaux collecteurs paraît défectueuse et est observable de concert avec un profil de VEs qui présument une atteinte lymphatique. Ces résultats restent à être confirmés avec le recrutement de sujets additionnels et l'évaluation de la corrélation avec le score de risque polygénique de développer une MCV, dans l'objectif ultime de faire des VEs et de la fonction lymphatique de nouveaux biomarqueurs dans l'identification précoce des MCV.

Mots-clés : vésicules extracellulaires, système lymphatique, athérosclérose, cytométrie en flux, maladie cardiovasculaire, imagerie proche infrarouge

Abstract

All cell types release extracellular vesicles (EVs) that carry different types of cellular cargo, such as proteins, lipids and nucleic acids. These small vesicles are found in all biological fluids including blood and lymph and can interact with neighboring cells. The lymphatic system is a preferred route for the mobilization of cholesterol from the arterial wall. We have demonstrated in a mouse model that lymphatic dysfunction precedes the development of atherosclerosis and that this dysfunction affects the contraction capacity of the collecting vessels. Based on these observations, we hypothesized that EVs contribute to *atherosclerosis-associated lymphatic dysfunction*. Therefore, we have initiated a translational study involving two groups of healthy subjects that differ in their risk of cardiovascular disease (CVD). We quantified several subtypes of circulating EVs on platelet-free plasma by ultraspecialized flow cytometry in the detection of small particles (> 100 nm) combined to other state-of-the art complementary techniques. Next, we assessed the lymphatic function using near-infrared imaging and injection of indocyanine green (ICG). Our preliminary results are promising for the role of EVs and lymphatic dysfunction in the development of atherosclerosis and corroborate with our observations made in mice. Individuals at high risk of CVD have signs of lymphatic dysfunction even before the onset of subclinical atherosclerosis. The mechano-sensitive response of their collecting vessels appears to be defective and is observable in concert with a profile of EVs that presume lymphatic damage. These results remain to be confirmed with the recruitment of additional subjects and the assessment of the correlation with the polygenic risk score of developing a CVD, in the hope of making these specific EV subsets and lymphatic function new biomarkers in the early detection of CVD.

Keywords: extracellular vesicles, lymphatic system, atherosclerosis, flow cytometry, cardiovascular diseases, infrared imaging

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des tableaux.....	7
Liste des figures.....	8
Liste des sigles et abréviations.....	9
Remerciements	11
Chapitre 1: Introduction.....	12
1.1. Athérosclérose.....	12
1.1.1. Facteur de risque.....	12
1.1.1.1. Âge et sexe.....	12
1.1.1.2. Antécédents familiaux	13
1.1.1.3. Dyslipidémie.....	13
1.1.1.4. Hypertension artérielle.....	13
1.1.1.5. Diabète.....	14
1.1.1.6. Habitude de vie	14
1.1.2. Physiopathologie	14
1.1.3. Biomarqueurs de l'athérosclérose	16
1.1.3.1. Protéine C-réactive	16
1.1.3.2. Interleukines	17
1.1.4. Transport inverse du cholestérol	17
1.2. Le système lymphatique.....	19
1.2.1. Structure et fonction système lymphatique	20
1.2.2. Marqueur des cellules endothéliales lymphatiques	21
1.2.2.1. Le récepteur VEGFR-3	22
1.2.2.2. La podoplanine.....	22
1.2.2.3. LYVE-1	23
1.2.3. Dysfonctionnement du système lymphatique	23
1.3. Les vésicules extracellulaires.....	24
1.3.1. Différents sous-types de vésicules extracellulaires	24
1.3.1.1. Les exosomes	24
1.3.1.2. Les microvésicules.....	25
1.3.1.3. Les corps apoptotiques	26
1.3.2. Étude des vésicules extracellulaires.....	27
1.3.2.1. Prélèvement sanguin et préparation de l'échantillon	28
1.3.2.2. Méthode de purification des VEs.....	28
1.3.2.3. Méthode de caractérisation et de quantification des VEs	29
1.3.3. Vésicules extracellulaires et athérosclérose	31
1.3.3.1. VEs dérivées de plaquettes.....	31
1.3.3.2. VEs dérivées des globules rouges	32
1.3.3.3. VEs dérivées de cellule endothéliale	33

1.3.3.4. VEs dérivées des leucocytes	34
1.3.4. Vésicules extracellulaires dans la lymphe	35
Chapitre 2 : Hypothèse et objectif de l'étude	37
2.1. Résumé des connaissances sur le sujet.....	37
2.2. Hypothèse et objectifs de l'étude	38
Chapitre 3 : Matériel et méthodes.....	39
3.1. Recrutement des participants	39
3.2. Déroulement de l'étude	40
3.3. Préparation des échantillons.....	40
3.4. Stratégie de marquage des VEs dans le plasma	41
3.4.1. Panel des anticorps	41
3.4.2. Marquages des VEs	42
3.4.3. Les tubes contrôles.....	43
3.5. Configuration du cytomètre en flux	43
3.6. Analyse des vésicules extracellulaires	44
3.7. Triage des vésicules extracellulaires.....	46
3.8. Analyse de la taille par NTA.....	46
3.9. Analyse des monocytes du sang.....	46
3.10. Mesure des cytokines inflammatoires.....	47
3.11. Analyse de la fonction lymphatique	47
3.11.1. Imagerie de la fonction lymphatique	47
3.11.2. Analyse des images fluorescentes.....	48
3.12. Analyses statistiques.....	49
Chapitre 4 : Résultats	50
4.1. La configuration du cytomètre permet la détection sensible des VEs.....	50
4.2. Stratégie d'identification des sous-populations de VEs	53
4.3. Caractérisation des évènements détectés	57
4.4. Les caractéristiques des sujets recrutés.....	59
4.5. Le dosage des cytokines inflammatoires ne semble pas discriminer les sujets du groupe ATCD 60	
4.6. La concentration de certains sous-types de VEs semble être modulé chez les sujets du groupe ATCD.....	61
4.7. Les sujets du groupe ATCD semblent avoir une vitesse de propulsion de la lymphe augmentée dans les vaisseaux collecteurs	66
Chapitre 5 : Discussion	68
Références bibliographiques.....	79

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exigences relatives à la caractérisation des VEs selon les recommandations de l'ISEV 2018	31
Tableau 2 : Rôle des différents sous-types de vésicules extracellulaires dans l'athérosclérose ...	35
Tableau 3 : Critères d'inclusion et d'exclusion de l'étude	40
Tableau 4 : Caractéristiques des sujets recrutés dans les deux groupes.....	60

Liste des figures

Figure 1. Rôle des vaisseaux lymphatiques dans le transport inverse du cholestérol au niveau d'une lésion d'athérosclérose.	19
Figure 2. Structure et fonctionnement du système lymphatique.	21
Figure 3. Biogenèse des différents sous-types de VEs.	27
Figure 4. Les VEs de plaquettes et de globules rouges interagissent avec les cellules endothéliales lymphatiques.	36
Figure 5. Stratégie de marquage des sous-populations de VEs.	42
Figure 6. Les étapes de l'analyse des vésicules extracellulaires par cytométrie en flux.	45
Figure 7. Imagerie des vaisseaux lymphatiques par proche infrarouge après injection intradermique et excitation du vert indocyanine.	48
Figure 8. Détection des VEs par V-SSC.	52
Figure 9. Illustration schématique de la stratégie d'identification des VEs.	54
Figure 10. Stratégie d'identification des VEs dérivées de globules rouges, plaquettes et lymphocytes.	55
Figure 11. Stratégie d'identification des VEs dérivées de monocytes, cellules progénitrices myéloïdes et cellules endothéliales.	56
Figure 12. Évaluation de la sensibilité des événements détectés au Triton X-100.	58
Figure 13. Mesure de la taille des VEs triées par NTA.	58
Figure 14. Dosage des cytokines inflammatoires dans le sérum des sujets.	61
Figure 15. Quantification des grands sous-types de VEs en circulation par cytométrie en flux. ..	63
Figure 16. Quantification des sous-types de VEs CD45 ⁺ en circulation par cytométrie en flux. ...	64
Figure 17. Pourcentage des sous-types de monocytes et VEs monocytes en circulation.	65
Figure 18. Quantification des sous-types de VEs CE en circulation par cytométrie en flux.	66
Figure 19. Analyse de la fonction lymphatique après imagerie par proche infrarouge.	67

Liste des sigles et abréviations

Apo : Apo-lipoprotéine
CB: *Counting beads*
CBA: *Cytometric Bead Array*
CEL : Cellule endothéliale lymphatique
CLEC-2 : *C-type lectin-like receptor 2*
CMH-I : Complexe majeur d'histocompatibilité
CML : Cellule musculaire lisse
CMV : Corps multivésiculaire
CRP : Protéine C-réactive
CST : *Cytometer Setup & Tracking*
eNOS : Oxyde nitrique synthase endothéliale
ESCRT : *Endosomal sorting complexes required for transport*
ET-1 : Endothéline
FACS : *Fluorescence-activated cell sorting*
FMO : *Fluorescence minus one*
FSC : *Forward scatter* ou lumière diffusée en avant
FT : Facteur tissulaire
GUI : *Graphical User Interface*
Hb : Hémoglobine
HDL : Lipoprotéine de haute densité
HF : Hypercholestérolémie familiale
hs-CRP : protéine C-réactive haute sensibilité
HTA : Hypertension artérielle
ICG : Vert indocyanine
IL : Interleukine
LDL : Lipoprotéine de basse densité
LDLR : Récepteur au LDL
LYVE-1 : *Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*
M-CSF : *Macrophage-colony stimulating factor*
MCV : Maladie cardiovasculaire
NO : Oxyde Nitrique

oxLDL : LDL oxydé

PCSK9 : Proprotéine convertase subtilisin/kexin de type 9

PDPN: Podoplanine

PFP: *Platelet-free plasma*

PGI2 : Prostacycline

PS : Phosphatidylsérine

RCT : Transport inverse du cholestérol

ROI : *Region of interest* ou région d'intérêt

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SRP : Score de risque polygénique

SSC : *Side scatter* ou lumière diffusée latérale

TLR: Récepteur Toll-Like

TNF: *Tumor necrosis factor*

VEs : Vésicules extracellulaires

VE CE : Vésicule extracellulaire dérivée de cellule endothéliale

VE CEV : Vésicule extracellulaire dérivée de cellule endothéliale vasculaire sanguine

VE GR : Vésicule extracellulaire dérivée de globule rouge

VE Leuco : Vésicule extracellulaire dérivée de leucocyte

VE Ly : Vésicule extracellulaire dérivée de lymphocyte

VE PLT : Vésicule extracellulaire dérivée de plaquette

VE CEL : Vésicule extracellulaire dérivée de cellule endothéliale lymphatique

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers ma directrice de recherche, **Dre. Catherine Martel**. Je la remercie pour avoir accepté de m'encadrer et de m'avoir fait confiance. Je profite également de l'occasion pour lui exprimer toute ma gratitude pour sa compréhension, ses conseils avisés et surtout ses encouragements tout au long de ma maîtrise. Elle m'a appris à ne jamais baisser les bras et comme elle le dit si bien « lâche pas ».

J'adresse de chaleureux remerciements à toute l'équipe du laboratoire, y compris les anciens membres : **Andreea Milasan, Gabriel Jean, Ali Smaani, Carl Fortin, Stéphanie Jarry et Laurent Vachon**. Merci de m'avoir appris tant de choses avec passion, sourire et convivialité.

Mes vifs remerciements vont également à ma colocataire et ma complice dans cette aventure, **Nadine Ardo**. Merci de m'avoir encouragée à prendre des risques.

Je ne peux pas finir ces remerciements sans penser à ma famille. À mon père et ma mère, **Joseph et Yolla**, et mes frères, **Rami et Samer**, les mots ne seront jamais suffisants pour vous remercier de tout l'amour et le support que vous me donnez, quels que soient mes choix. Merci d'être toujours présents à mes côtés malgré la distance qui nous sépare.

Finalement, je tiens à remercier les membres du jury, **Dr Guy Rousseau et Dre Stéphanie Lehoux** qui me font le grand honneur d'évaluer ce travail.

Chapitre 1: Introduction

1.1. Athérosclérose

L'athérosclérose est désormais reconnue en tant que maladie inflammatoire chronique (1) qui est la principale cause des maladies cardiovasculaires (MCV). Elle est fréquemment à l'origine des complications cliniques tel que les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux qui comptent à eux seules 15,2 millions de décès au total en 2016 (2). Malgré les efforts pour mieux comprendre cette maladie multifactorielle, la pathogenèse de l'athérosclérose demeure grandement incomprise.

1.1.1. Facteur de risque

Un facteur de risque est toute condition ou exposition du sujet connue pour augmenter le risque de survenue de la maladie (3). Dans le cadre de l'athérosclérose, cette définition implique un lien causal entre le facteur de risque et le développement de la plaque et que la suppression ou l'amélioration de ce facteur réduirait l'incidence de la maladie. Jusqu'à présent, plusieurs facteurs de risque modifiables ou non modifiables ont été identifiés et associés à l'athérosclérose. D'ailleurs, en l'absence de traitement spécifique de l'athérosclérose, la correction des facteurs de risque modifiables reste pour le moment le meilleur moyen pour retarder la progression de la lésion (4).

1.1.1.1. Âge et sexe

Le processus de vieillissement touche l'ensemble des organes et tissus. Ainsi avec l'âge, les vaisseaux sanguins subissent plusieurs modifications entraînant une perte de l'élasticité vasculaire, une augmentation de la dysfonction endothéliale ainsi qu'une augmentation de la pression artérielle (5). Les hommes sont plus à risque de développer une MCV que les femmes au cours de leur vie (6, 7). En revanche, la perte de la protection hormonale en postménopause expose les femmes à risque accru de MCV. En effet, selon l'étude de Framingham, la ménopause est associée à une augmentation du risque de MCV de 4.1 fois sur 10 ans chez les femmes âgées de 50 à 59 ans (8).

1.1.1.2. Antécédents familiaux

Seuls les antécédents familiaux d'accidents cardiovasculaires prématurés chez un parent du premier degré sont à prendre en considération. Ce facteur de risque est défini par la survenue de MCV chez le père avant l'âge de 55 ans ou avant 65 ans chez la mère. Les individus qui répondent à ces critères sont alors 60 % à 75 % plus à risque de MCV (9).

1.1.1.3. Dyslipidémie

La dyslipidémie est un joueur clé dans la survenue de MCV (10). Il a été longtemps établi que les concentrations plasmatiques de cholestérol prédisent le risque de développer des plaques d'athérome. En 1979, Carlson *et al.* avaient déjà démontré que pour toute augmentation de 1% du taux de cholestérol total, il y a une augmentation de 2 à 3 % de l'incidence des maladies coronariennes (11). Des études plus récentes ont permis de déplacer notre attention plus particulièrement sur la quantité de cholestérol transportée par les lipoprotéines de basse densité (LDL) ou de haute densité (HDL) pour mieux prédire le risque. Des taux élevés de LDL-cholestérol (LDL-C) ainsi que de faible taux de HDL-cholestérol (HDL-C) sont associés à un risque accru d'accidents cardiovasculaires (12). Ces observations sont surtout confirmées chez les sujets souffrants d'hypercholestérolémie familiale (HF). Cette maladie génétique est causée par des mutations au niveau des gènes *LDLR*, *APOB* et *PCSK9* qui codent respectivement pour le récepteur aux LDL (LDLR), l'apolipoprotéine B (ApoB) et la proprotéine convertase subtilisin/kexin de type 9 (*PCSK9*). L'HF est de plus caractérisée par des taux de LDL-C très élevés (> 4.5 mmol/L) et le développement de l'athérosclérose tôt dans la vie. Ces individus sont ainsi exposés à un risque majeur de MCV prématurées du fait de leur dyslipidémie (13). L'hypertriglycéridémie est un autre type de dyslipidémie, mais dont la contribution au risque cardiovasculaire a été très controversée. Cela s'explique par le fait que les triglycérides dépendent en grande partie d'autres facteurs de risque (12). À la lumière de plusieurs études de cohorte prospectives, les triglycérides sont maintenant reconnus comme un facteur de risque indépendant de MCV (14-16).

1.1.1.4. Hypertension artérielle

L'hypertension artérielle (HTA) se définit par une pression artérielle systolique ≥ 140 mm Hg et/ou diastolique ≥ 90 mm Hg (17). Elle est un facteur de risque très important de MCV à cause de sa

forte prévalence et incidence. En effet, selon l'étude de Framingham, 90% de la population d'âge moyen ou âgée risque de développer une HTA à un moment ou un autre de sa vie (18).

1.1.1.5. Diabète

Les MCV sont la cause la plus fréquente de mortalité et de morbidité chez la population diabétique faisant état du lien étroit entre ces deux pathologies (19). Cela est dû aux effets délétères de l'hyperglycémie persistante sur les vaisseaux sanguins mais aussi à la coexistence d'autres désordres et facteurs métaboliques (20). En effet, 97 % des diabétiques souffrent de dyslipidémie avec de faible taux d'HDL-C, des taux élevés de triglycérides et une prédominance de petites particules denses de LDL, connues pour être très athérogène (21).

1.1.1.6. Habitude de vie

Les autres facteurs de risque de MCV sont plutôt liés au mode et habitude de vie. Le tabagisme, l'alimentation malsaine, l'obésité, la sédentarité et la consommation excessive d'alcool sont connus pour augmenter la survenue de MCV. Ils favorisent les facteurs de risque traditionnels dont l'HTA, la dyslipidémie et l'hyperglycémie. De plus, ces mauvaises habitudes de vie sont étroitement liées à des conditions impliquées dans les MCV tels que la dysfonction endothéliale, le stress oxydatif, l'inflammation, la thrombose /coagulation et l'arythmie (22).

1.1.2. Physiopathologie

Russel Ross a décrit la pathogénèse de l'athérosclérose comme étant une réponse à une agression « *response to injury* » (23),(24). De façon générale, cette hypothèse soutient le fait que le mécanisme initiateur serait une agression de l'endothélium vasculaire par des substances nocives (hypercholestérolémie, agent infectieux, hyperglycémie etc.) ou un stress hémodynamique (flux sanguin turbulent, HTA etc.)(24). Les travaux qui ont fait suite à cette hypothèse permettent d'affirmer que le LDL sous forme oxydée serait l'agent d'agression le plus probable à l'origine de la lésion endothéliale (25). En condition normale, l'endothélium vasculaire participe au maintien du tonus vasculaire grâce à la libération de plusieurs médiateurs vasodilatateurs tels que l'oxyde nitrique (NO) et la prostacycline (PGI₂) ou vasoconstricteurs comme l'endothéline (ET-1). Il contrôle également la perméabilité vasculaire et présente des propriétés antithrombotiques. En revanche, face à une agression, l'endothélium endommagé subit une modulation phénotypique

associée à la dysfonction endothéliale (26). Cet état pathologique est surtout caractérisé par une perturbation de la balance vasodilatation/vasoconstriction. En effet, il y a une diminution de la biodisponibilité du NO et une surexpression d'ET-1(27). De plus, l'endothélium acquiert un phénotype proinflammatoire et prothrombotique caractérisé par une dérégulation des niveaux d'expression des molécules d'adhésion et le relargage de plusieurs facteurs solubles (par exemple, les cytokines pro-inflammatoires, les facteurs de croissance et les facteurs chimiotactiques). Ces dérèglements augmentent alors la perméabilité vasculaire, favorisant l'adhésion et la migration des monocytes mais également l'infiltration excessive de LDL dans l'intima (26). À ce niveau, les monocytes se différencient en macrophages sous l'action du *macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF) et les particules de LDL subissent des modifications oxydatives pour former davantage de LDL oxydées (oxLDL) (28). Ces réactions d'oxydation jouent un rôle clé dans la progression de l'athérosclérose (29). En effet, les oxLDL vont être internalisées par les macrophages via leurs récepteurs éboueurs « *scavengers* » (SRA : *Scavenger Receptor A* ; CD36), ou même leurs récepteurs Toll-like (TLR) (28). Contrairement au LDLR, les récepteurs éboueurs ne subissent pas de rétro-contrôle négatif après l'internalisation du cholestérol. Cela étant, les macrophages se retrouvent engorgés de lipides et finissent par évoluer en cellules spumeuses « *Foam cells* » qui s'accumulent dans l'intima et constituent les premières lésions d'athérome (30). Quant aux TLR, leur implication dans ce processus induit une activation efficace et robuste des macrophages. En réponse à ceci, les macrophages libèrent des cytokines proinflammatoires (interleukine 1- β , *tumor necrosis factor* (TNF)), des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des métalloprotéinases qui vont induire la progression de la lésion d'athérome (28). Ces médiateurs recrutent d'une part plus de monocytes au site de la lésion et d'une autre part induisent la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) de la média vers l'intima. Ces dernières contribuent activement à la progression de l'athérosclérose. Une fois au niveau de l'intima, les CML se multiplient et sécrètent plusieurs éléments de la matrice extracellulaire pour former la chape fibreuse (collagène, élastine, protéoglycane)(31). Elles peuvent également internaliser du oxLDL pour acquérir un phénotype de cellules spumeuses « *macrophage-like* » et contribuer au processus inflammatoire (32). La toxicité de l'oxLDL et les réactions inflammatoires amplifiées induisent alors la mort des macrophages et des cellules

spumeuses qui sont à l'origine du noyau lipidique de la lésion d'athérome. Il est important de noter que toutes ces réactions sont accompagnées de libération de vésicules extracellulaires (VEs) (33) qui seront abordées dans la section 1.3.

Pour résumer, la plaque d'athérosclérose débute par une strie lipidique qui évolue progressivement en une plaque fibro-lipidique. Ce type de lésion est, comme son nom l'indique, formé d'un noyau lipidique isolé de la lumière artérielle par une chape fibreuse riche en CML et matrice extracellulaire. Lors de la progression de la lésion, le cœur lipidique s'élargit, mais la chape fibreuse peut au contraire s'amincir. La composition de la plaque détermine alors sa vulnérabilité et son risque de rupture plutôt que le degré de sténose qu'elle provoque. On parle de plaque stable qui est « à faible risque » lorsque la chape fibreuse est suffisamment épaisse pour stabiliser la plaque et la protéger de la rupture. À l'inverse, les plaques instables « à haut risque » ont un noyau lipidique inflammatoire assez important mais une chape fibreuse très fine. Elles sont donc à risque de rupture et de formation d'un thrombus à l'origine d'accident vasculaire aigu (angor instable, infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral) (34).

1.1.3. Biomarqueurs de l'athérosclérose

Il a été démontré que chez l'adulte, la moitié des accidents cardiovasculaires surviennent chez des sujets en apparence sains et ne présentant pas les facteurs de risque traditionnels (35). Par conséquent, il apparaît opportun de combiner les biomarqueurs de l'athérosclérose avec les facteurs de risque traditionnels pour améliorer la stratification du risque cardiovasculaire. Puisque l'inflammation est une composante majeure de l'athérosclérose, plusieurs biomarqueurs inflammatoires semblent prometteurs pour la prédiction du risque cardiovasculaire (36).

1.1.3.1. Protéine C-réactive

La protéine C-réactive (CRP) est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation sécrétée par le foie en réponse aux cytokines tel que l'IL-1 β , IL-6 et TNF- α . En présence d'athérosclérose, la CRP est libérée en faible quantité d'où l'émergence des techniques de dosage de CRP à haute sensibilité (hs-CRP) pour une meilleure détection de ce paramètre (37). Plusieurs études prospectives démontrent une relation dose-réponse entre les taux hs-CRP et le risque de MCV. Des valeurs seuils de hs-CRP ont ainsi été proposées pour évaluer le risque cardiovasculaire : les

sujets ayant des taux de hs-CRP < 1.0 mg/L sont considérés à faible risque de MCV, ceux dont le taux de hs-CRP est entre 1.0 et 3.0mg/L sont à risque modéré de MCV et enfin des taux de hs-CRP > 3.0 mg/L indique que le sujet est à haut risque de MCV (38). L'augmentation du hs-CRP témoigne alors de la présence d'une inflammation à bas bruit mais son manque de spécificité rend son interprétation difficile. Son efficacité en pratique courante reste à démontrer (37).

1.1.3.2. Interleukines

Les cytokines sont une famille de peptides solubles impliqués dans la signalisation intercellulaire. Parmi celles-ci on retrouve les interleukines, un sous-groupe de cytokines qui agit comme médiateurs inter-leucocytaires. Elles participent notamment à l'initiation et au maintien de la réponse inflammatoire associée à l'athérosclérose (37). Le rôle central de l'IL-6 dans ce processus inflammatoire justifie son potentiel en tant que biomarqueur de l'athérosclérose. En effet, l'étude de Framingham a révélé une association modeste entre l'IL-6 et la présence d'une lésion d'athérome au niveau de la carotide (39). L'étude de cohorte prospective « Health ABC » a également démontré que les sujets présentant des taux élevés d'IL-6 étaient 2 à 5 fois plus à risque de MCV (40). Son usage en clinique pourrait cependant être limité en raison de la grande variabilité interindividuelle de sa concentration plasmatique (41). TNF- α est une autre cytokine inflammatoire impliquée dans la pathogenèse de l'athérosclérose. Il a été démontré que le taux de TNF- α en circulation prédisait la survenue de MCV ainsi que la mortalité uniquement chez les hommes (42). Ce paramètre est cependant plus efficace pour prédire les maladies coronariennes en particulier. Une étude a révélé en effet une association entre le taux de TNF- α et la sévérité de la maladie coronarienne et ceci de manière indépendante (43).

1.1.4. Transport inverse du cholestérol

Comme déjà mentionné, l'accumulation de l'oxLDL dans les macrophages est une étape primordiale dans la formation de la plaque d'athérome. Une fois internalisé par les macrophages, le cholestérol provenant des LDL s'accumule dans la cellule sous forme libre ou estérifié. En raison de la toxicité du cholestérol libre, ces cellules ont développé plusieurs mécanismes de défense dont le plus important est le transport inverse du cholestérol (RCT) (44). La première étape du RCT fait entrer en jeu des accepteurs de cholestérol tel que l'apoA-I et le HDL, lui-même constitué

en grande partie d'apoA-I (45) (**Figure 1**). Quant au mécanisme d'efflux, il fait appel aux transporteurs ABCA1 et ABCG1 et au récepteur SR-B1 exprimés à la surface des macrophages (44). Les accepteurs de cholestérol se dirigent ensuite vers la circulation sanguine, majoritairement via les vaisseaux lymphatiques. D'ailleurs, la présence des vaisseaux lymphatiques dans l'adventice des vaisseaux a été décrite par Hoggan *et al.* en 1882 (46) mais ce n'est que beaucoup plus tard que leur rôle dans le RCT a été élucidé (47). Il est désormais accepté que les particules de HDL chargées de cholestérol sont captées par les capillaires lymphatiques présents dans l'adventice du vaisseau sanguin pour ensuite être propulsées par les vaisseaux collecteurs lymphatiques jusqu'à la circulation sanguine. À ce niveau, le HDL sera pris en charge par le foie et le cholestérol sera ainsi éliminé et excrété par la bile et/ou les intestins (**Figure 1**).

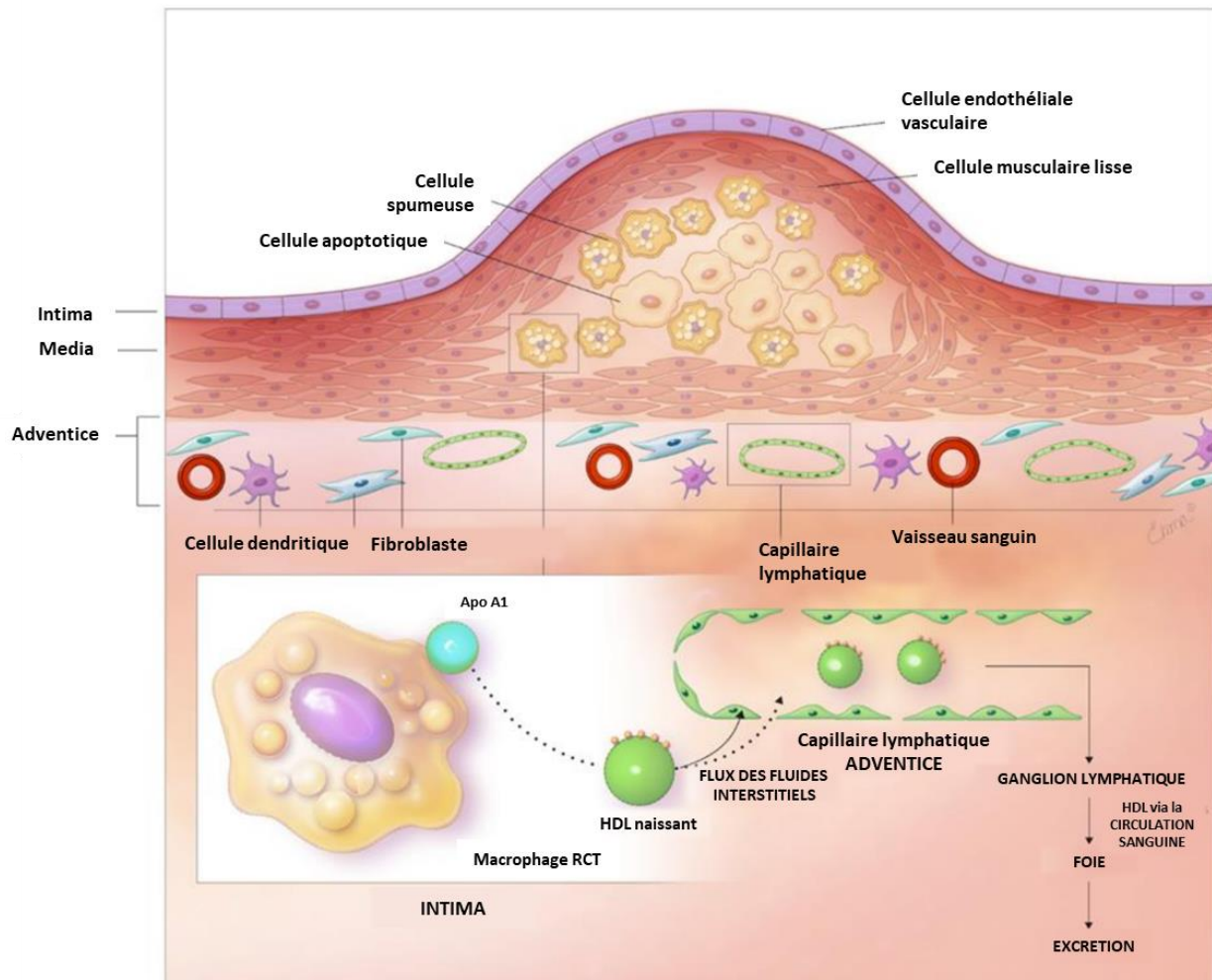


Figure 1. Rôle des vaisseaux lymphatiques dans le transport inverse du cholestérol au niveau d'une lésion d'athérosclérose.

Les cellules spumeuses se libèrent du cholestérol en excès via les transporteurs ABCA1 et ABCG1. Ce cholestérol sera capté par l'apo A-I, composante majeure de l'HDL. L'HDL naissant progresse vers l'adventice où il sera pris en charge par les capillaires lymphatiques. Les contractions des vaisseaux collecteurs lymphatiques permettent ensuite le transport de l'HDL jusqu'à la circulation sanguine. À ce niveau, la particule d'HDL sera internalisée par les cellules hépatiques et le cholestérol excrété. (Adapté de Csányi et al. *J. Clin. Med.* **2019**, 8(4), 495) (48)

1.2. Le système lymphatique

Le système lymphatique est composé de vaisseaux initiaux (capillaires) et collecteurs, de ganglions lymphatiques et d'organes lymphoïdes, ce qui forme un réseau complexe parcourant l'ensemble du corps. Il participe au maintien de l'homéostasie tissulaire en drainant l'excès de liquides interstitiels ainsi que leur contenu en protéines et en solutés. Il favorise de plus les

réactions immunitaires puisqu'il assure le transport des cellules immunitaires jusqu'au ganglion lymphatique. Sur le plan nutritif, le système lymphatique est impliqué dans l'absorption des lipides alimentaires sous forme de chylomicron au niveau des entérocytes (49). Enfin, tel que déjà mentionné, il est désormais reconnu comme un acteur clé du RCT (47).

1.2.1. Structure et fonction système lymphatique

Le système lymphatique débute dans des capillaires lymphatiques qui ressemblent à des tubules obstrués à l'une de leurs extrémités. Ils sont formés d'une monocouche de cellules endothéliales lymphatiques (CEL) et se caractérisent par des jonctions intercellulaires lâches qui permettent l'entrée des fluides et des macromolécules à l'origine de la formation de la lymphe (**Figure 2A**) (50). La fonction des capillaires dépend surtout de fibres élastiques appelées filaments d'ancrage qui les lient à la matrice extracellulaire. En effet, lors de l'augmentation de la pression interstitielle, ces filaments tirent sur les CEL et assurent l'expansion des jonctions et donc la résorption accrue du liquide interstitiel (51). Avec l'entrée des fluides dans les capillaires et la diminution de ce gradient de pression, les jonctions se referment empêchant ainsi un flux rétrograde dans l'interstitium (52). Les capillaires lymphatiques fusionnent ensuite en un réseau de vaisseaux collecteurs lymphatiques qui assurent la progression de la lymphe jusqu'à la circulation sanguine. Les CEL des vaisseaux collecteurs lymphatiques sont liées entre elles par des jonctions serrées « *zipper-like* » qui favorisent l'intégrité des vaisseaux et empêchent la fuite de lymphe (**Figure 2A**)(53). Les vaisseaux collecteurs se caractérisent également par la présence d'une couche de cellules musculaires lymphatiques et de valves unidirectionnelles. Chaque segment de vaisseaux situé entre deux valves constitue une unité de pompage appelée lymphangion. Une fois rempli de lymphe, le lymphangion se contracte spontanément grâce aux cellules musculaires lymphatiques qui l'entourent et la valve en aval s'ouvre puis se referme pour permettre le passage unidirectionnel de la lymphe dans le segment suivant. Ce mécanisme se répète tout le long des vaisseaux collecteurs, lymphangion par lymphangion, jusqu'à ce que la lymphe rejoigne la circulation sanguine (**Figure 2B**) (54). La contraction des lymphangions est modulée par un ensemble de facteurs physiques (force de cisaillement, la pression transmurale

etc.) et biochimiques (NO, agoniste adrénergique et certaines hormones). En plus de ceci, il existe plusieurs forces extrinsèques qui favorisent également le transport de la lymphe comme la contraction des muscles squelettiques, les mouvements respiratoires ou la pression artérielle (55). Tous les facteurs cités ci-dessus vont alors permettre la progression de la lymphe pour atteindre le sang au niveau de la veine sous-clavière. Le site de séparation entre les deux circulations se caractérise par un agrégat plaquettaire induit par interaction entre la protéine *C-type lectin-like receptor 2* (CLEC-2) présente à la surface des plaquettes et la podoplanine (PDPN) à la surface des cellules endothéliales lymphatiques, ce qui résulte en la libération par les plaquettes de « *bone morphogenetic protein* » (BMP-9), protéine inhibant la prolifération et la migration des CEL (56). Dans un modèle de souris déficientes en CLEC-2, on observe d'ailleurs un mélange du sang et de la lymphe par absence d'agrégation plaquettaire (57).

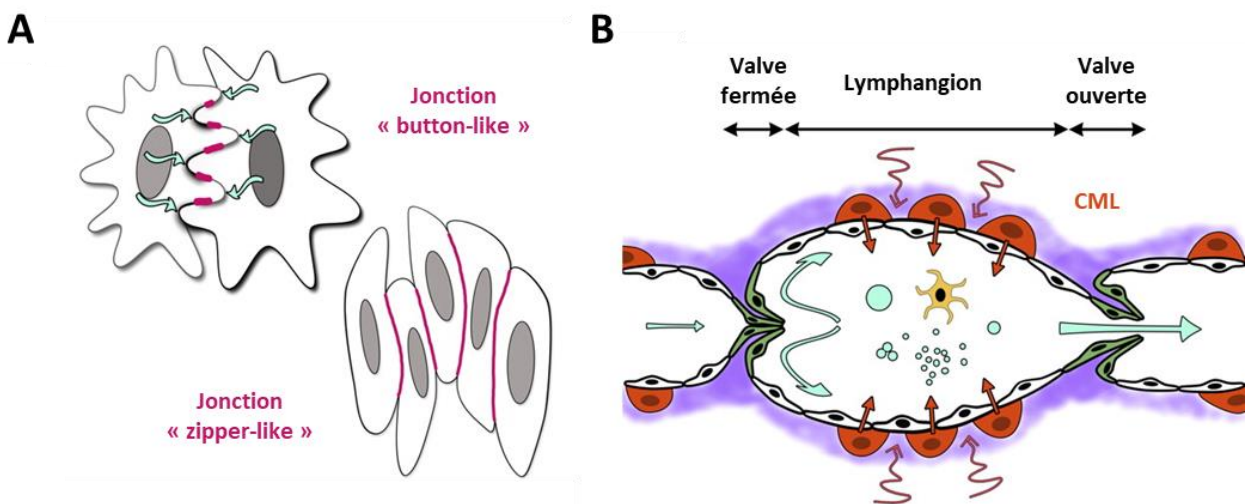


Figure 2. Structure et fonctionnement du système lymphatique.

(A) Les jonctions au niveau des capillaires lymphatiques sont lâche du type « button-like » alors que les vaisseaux collecteurs se caractérisent par des jonctions serrées « zipper-like ». (B) La propulsion de la lymphe est assurée par les cycles d'ouverture/fermeture de valves associés à la contraction des cellules musculaires lymphatiques. CML : Cellule musculaire lymphatique. (Adapté de Schulte-Merker et al. JCB 2011, 193 (4), 607-618) (58)

1.2.2. Marqueur des cellules endothéliales lymphatiques

Autre que le CD31 qui est un marqueur pan-endothéliale, les CEL se caractérisent par des marqueurs plus spécifiques permettant de les distinguer des cellules endothéliales vasculaires (CEV).

1.2.2.1. Le récepteur VEGFR-3

La lymphangiogenèse dépend en grande partie de l'activation du « *vascular endothelial growth factor receptor 3* » (VEGFR-3) par les facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D. Ces voies de signalisation contribuent d'ailleurs à la prolifération, la migration et la survie des CEL (49). Contrairement au VEGF-D (59), le VEGF-C est indispensable au développement embryonnaire des vaisseaux lymphatiques. En effet, la délétion du gène codant pour le VEGF-C chez la souris entraîne une létalité embryonnaire par défaut de formation des vaisseaux lymphatiques (60). Il est toutefois intéressant de souligner que chez des souris *VEGFR-3^{-/-}*, il y a aussi une mortalité embryonnaire encore plus précoce au cours du développement à cause d'une anomalie vasculaire. Ceci s'explique par le fait que le VEGFR-3 est également exprimé par les CEV au stade embryonnaire (61). Sa présence est essentielle à la formation du système cardiovasculaire en premier, suivie de la formation du système lymphatique (61) (49). Cet ordre est crucial puisque les vaisseaux lymphatiques sont formés par bourgeonnement à partir des veines. Il a longtemps été décrit que l'expression du VEGFR-3 à l'âge adulte se limitait aux CEL (62) mais les études suggèrent que celui-ci est toujours exprimé par les CEV, mais à un nettement moindre degré, (63) et par certains macrophages (64).

1.2.2.2. La podoplanine

La PDPN est une protéine transmembranaire présente à la surface des CEL (65). Elle n'est pas exprimée par les CEV ce qui lui confère un avantage en tant que marqueur lymphatique par rapport au VEGFR-3. Elle constitue jusqu'à présent le seul ligand endogène connu du CLEC-2, qui est exprimé par les plaquettes mais aussi les cellules dendritiques activées (66). L'interaction de ces protéines joue un rôle fondamental dans la séparation des circulations sanguine et lymphatique, comme déjà mentionné plus haut (56). Elle contribue de plus à la migration des cellules dendritiques jusqu'au nœud lymphatique (66). Même si elle convient à la distinction entre CEV et CEL, la PDPN n'est pas un marqueur parfait des lymphatiques puisqu'elle est aussi exprimée par d'autres types cellulaires (67)

1.2.2.3. LYVE-1

Le LYVE-1 (*Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*) est un récepteur de l'acide hyaluronique, composante principale de la matrice extracellulaire. Il est fortement exprimé par les capillaires lymphatiques, à l'opposé des vaisseaux collecteurs qui ne l'expriment pas ou alors très faiblement (vaisseaux pré-collecteurs)(68). LYVE-1 est également exprimé par les macrophages activés (69). Au niveau physiologique, LYVE-1 assure le transport lymphatique de l'acide hyaluronique depuis les tissus conjonctifs vers les ganglions lymphatiques où il sera dégradé (70). De même, il a récemment été démontré que le LYVE-1 facilite l'entrée des cellules dendritiques dans le système lymphatique et leur migration vers les ganglions lymphatiques. Cette fonction découle de sa capacité à lier l'acide hyaluronique présent à la surface des cellules dendritiques (71). Il faut tout de même souligner que la délétion totale du LYVE-1 n'entraîne pas une mortalité embryonnaire chez les souris. Ces observations suggèrent que ce récepteur n'a probablement pas de rôle clé dans le développement du système lymphatique, contrairement au VEGFR-3 (72).

1.2.3. Dysfonctionnement du système lymphatique

Le système lymphatique est connu pour participer à l'homéostasie tissulaire, aux réponses immunitaires, à l'absorption des lipides alimentaires et au RCT. Il est donc concevable que toutes anomalies ou dysfonctions lymphatiques puissent affecter l'une ou l'autre de ses fonctions. Outre sa caractérisation dans le lymphœdème primaire et secondaire, la dysfonction lymphatique est maintenant associée à des maladies inflammatoires chroniques tel l'athérosclérose (73, 74). Les travaux de notre laboratoire ont démontré que dans un modèle de souris prédisposé à développer de l'athérosclérose (*Ldlr*^{-/-} ; *hApoB100*^{+/+}), il y a une dysfonction lymphatique qui précède la formation de la lésion et que cette dysfonction touche principalement la capacité de contraction des vaisseaux collecteurs (74). De plus, l'amélioration précoce de la fonction lymphatique chez des souris *Ldlr*^{-/-} grâce au traitement ciblé par du VEGF-C semble moduler l'apparition de l'athérosclérose et stabiliser la plaque (75). Toutes ces observations ne font que confirmer l'importance du système lymphatique dans l'athérosclérose mais elles restent à être vérifiées chez les humains.

1.3. Les vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires (VEs) suscitent un intérêt croissant chez les chercheurs depuis plus de 50 ans. L'histoire de leur découverte remonte à 1946 lorsque Erwin Chargaff et Randolph West démontrent qu'un plasma exempt de plaquettes est toujours capable de coaguler. Ils réussissent même à isoler par centrifugation la fraction du plasma qui lui confère cette activité procoagulante sans pour autant l'identifier (76). Les travaux de Peter Wolf en 1967 viennent compléter cette découverte en caractérisant le contenu de cette fraction. Il montre par microscopie électronique que cette fraction est constituée de particules dérivées de plaquettes activées riches en phospholipides, qu'il nomme « *platelet dust* » (77). Avec le temps ce terme a été remplacé par microparticules puis par VEs. L'utilisation du terme générique VEs est désormais recommandée par la Société Internationale des Vésicules Extracellulaires (ISEV) pour désigner toute particule libérée par la cellule qui se caractérise par une bicouche lipidique et l'absence de noyau (78). Il est désormais accepté que les VEs sont produites par toutes les cellules de l'organisme. Une fois secrétées dans le milieu extracellulaire, elles peuvent interagir avec des cellules voisines ou à distance en circulant via les différents fluides. Les VEs se retrouvent dans plusieurs fluides biologiques(79) tels que le sang, la salive, l'urine, le lait maternel, la bile, l'ascite, le liquide cérébro-spinal et même la lymphe, tel que notre laboratoire l'a décrit (80). Elles apparaissent aujourd'hui comme des médiateurs clés de la communication intercellulaire, mais aussi de potentiels biomarqueurs de plusieurs pathologies. Cela s'explique par leur contenu riche en protéine, lipide et acide nucléique qui d'une part reflète la composition de la cellule d'origine et d'une autre part module l'activité d'autres cellules (81)

1.3.1. Différents sous-types de vésicules extracellulaires

Pour prendre compte de la différence de taille et de biogenèse de ces particules, les VEs sont classées en trois sous-types soit les exosomes, les microvésicules et les corps apoptotiques (78).

1.3.1.1. Les exosomes

Les exosomes sont des vésicules de taille comprise entre 30 et 100nm secrétées par toutes les cellules à l'état normal ou pathologique. Leur biogenèse se fait dans les corps multivésiculaires (CMV), un type d'endosome produit à la suite de l'invagination de la membrane plasmique. Ces

CMV incorporent de manière spécifique des protéines et des lipides destinés soit à être dégradés après fusion avec le lysosome soit à être libérés après fusion avec la membrane plasmique. La libération du contenu des CMV dans le milieu extracellulaire se fait alors sous forme de vésicules appelées exosomes (**Figure 3**) (79). La biogenèse des exosomes peut être divisée en deux étapes clés. La première étape consiste en une réorganisation des protéines à la surface des CMV en de microdomaines riches en protéines membranaires dont les tétraspanines (82). La seconde étape implique les protéines de la voie « *Endosomal sorting complexes required for transport* » (ESCRT) associées aux protéines Alix et « *Tumor susceptibility gene 101* » (TSG101). Cet ensemble protéique participe à la formation des futures exosomes dans la lumière des CMV par invagination et bourgeonnement de la membrane endosomale (83). Les protéines de la famille Rab contribuent aussi à la formation des exosomes en régulant notamment le transport des CMV et leur fusion avec la membrane plasmique. L'origine endosomale des exosomes explique en quelque sorte leur composition distincte de celle de la membrane cellulaire. Par exemple ils sont enrichis en tétraspanines (CD9, CD63 et CD81), Alix et TSG101. Au niveau lipidique, les exosomes ont tendance à contenir plus de cholestérol et de sphingomyéline comparés à la membrane plasmique (79). Quant à leur rôle physiologique, certaines études suggèrent que les exosomes participent au maintien de l'homéostasie cellulaire (84). En effet, en cas de stress ou d'agression, la cellule peut se débarrasser de certaines de ces composantes toxiques en les expédiant vers le milieu extracellulaire via les exosomes. Ces exosomes seront ensuite phagocytés ou pourront interagir avec les cellules environnantes pour les informer des conditions de stress accrus (84). D'ailleurs plusieurs conditions pathologiques tel que les cancers (85) sont accompagnées d'une augmentation de la sécrétion d'exosome avec une modification de leur composition d'où leur rôle en tant que potentiel biomarqueur.

1.3.1.2. Les microvésicules

Les microvésicules sont des particules très hétérogènes en taille (100 à 1000 nm) et en contenu. Elles proviennent du bourgeonnement de la membrane plasmique et reflètent par conséquent l'état et la nature de la cellule d'origine (**Figure 3**) (79). À l'état de repos, la répartition des phospholipides constituant la membrane est inégale. Par exemple, la phosphatidylsérine (PS) est principalement localisée sur le feuillet interne de la bicouche lipidique alors que la

phosphatidylcholine se trouve uniquement sur le feuillet externe. Cette asymétrie est maintenue par des processus actifs qui dépendent de plusieurs transporteurs (86). En cas de stimulation de la cellule, l'augmentation du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire module l'activité de ces transporteurs ce qui se traduit par une redistribution des phospholipides membranaires. La perte de l'asymétrie provoque alors l'externalisation de la PS ainsi que la formation de bourgeons et leur libération dans le milieu extracellulaire. C'est ainsi que sont formées les microvésicules qui présentent à leur surface la PS externalisée et d'autres marqueurs spécifiques à la cellule d'origine (87). Puisque certaines microvésicules ne portent pas de PS, il existe probablement d'autres mécanismes qui contribueraient à la biogenèse de ce type de VEs. Toutefois, il est intéressant de noter que la PS assure la reconnaissance et l'élimination de ces vésicules par les phagocytes, mais elle est aussi capable de lier et d'activer les facteurs de coagulation. Cette dernière caractéristique confère aux microvésicules PS⁺ un potentiel prothrombotique surtout pour celles dérivées de plaquettes (88). D'ailleurs en condition normale, les microvésicules secrétées par les plaquettes constituent plus de 80 % des microvésicules en circulation (89)

1.3.1.3. Les corps apoptotiques

Les corps apoptotiques sont des vésicules de 1 à 5µm libérées par les cellules en apoptose (90). Au cours de ce phénomène d'autodestruction, la cellule subit plusieurs modifications morphologiques : condensation du cytoplasme et du noyau, fragmentation de l'ADN, externalisation de la PS et, enfin, bourgeonnement de la membrane plasmique (*blebbing*) pour aboutir à la dégradation de la cellule et la libération de ces larges vésicules appelées corps apoptotiques (**Figure 3**) (90, 91). Ces derniers renferment une partie du cytoplasme, de l'ARN, de l'ADN et des organites intacts dont la mitochondrie (92). Les corps apoptotiques sont libérés pour assurer une élimination « propre » du contenu cellulaire à la suite de l'apoptose. En effet, ce contenu a un fort potentiel immunogène et son relargage dans le milieu extracellulaire induirait des réactions inflammatoires locales. En les emballant dans des vésicules, le contenu de la cellule sera éliminé par les macrophages qui reconnaissent la PS exprimée sur les corps apoptotiques, évitant ainsi toutes réponses inflammatoires (90). La fonction de ces corps apoptotiques ne se limite pas seulement à la clairance des composantes cellulaires puisqu'ils participent aussi à la communication intercellulaire. Par exemple dans le cadre de maladie auto-

immune comme le lupus érythémateux, ces corps apoptotiques semblent faciliter le transport d'auto-antigène à des cellules présentatrices d'antigènes ce qui favorise les réactions auto-immunitaires (93).

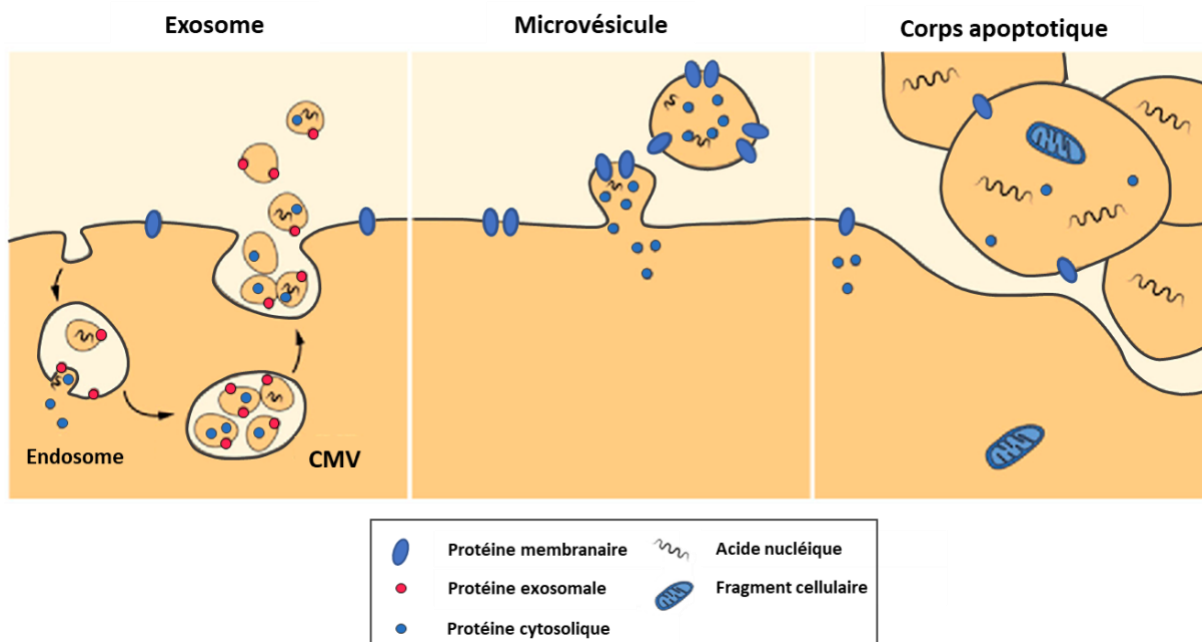


Figure 3. Biogenèse des différents sous-types de VEs.

Les exosomes sont formés dans les endosomes et sont libérés après fusion des CMV avec la membrane plasmique. Quant aux microvésicules, elles proviennent du bourgeonnement de la membrane plasmique. Enfin les corps apoptotiques sont relargués dans l'espace extracellulaire par des cellules en apoptose. Toutes les VEs portent des protéines membranaires, des protéines cytosoliques et des acides nucléiques, mais la nature de ces composants cellulaires diffère d'un sous-type à un autre. CMV : Corps multivésiculaire (Adapté Pollet et al. Biomolecules 2018, 8(3), 94) (94)

1.3.2. Étude des vésicules extracellulaires

Même si la recherche sur les VEs ne cesse de gagner de l'importance, nos connaissances sur ce sujet restent très limitées. Leur petite taille, la faible densité antigénique à leur surface et le manque de sensibilité des appareils conventionnels sont des exemples de facteurs limitants l'étude sur les VEs. L'absence de standardisation des méthodes d'isolation et de caractérisation des VEs ralentit davantage l'avancée de nos connaissances sur les VEs. Pour remédier à ce problème, plusieurs recommandations ont été mises en place pour servir de base à l'étude des VEs, dont celles de l'ISEV (78). Puisque dans le cadre de ce mémoire on s'intéresse aux VEs

plasmatiques, je me contenterai de présenter les recommandations spécifiques à ce type de manipulation.

1.3.2.1. Prélèvement sanguin et préparation de l'échantillon

La maîtrise des conditions pré-analytiques est primordiale pour conserver la qualité des échantillons et éviter la libération de nouvelles vésicules artéfactuelles (vésiculation). Il est recommandé de prélever le sang dans des tubes contenant du citrate comme anticoagulant. L'EDTA est connu pour agglutiner les plaquettes et donc produire des VEs et l'héparine n'inhibe pas la vésiculation *in vitro*. Le prélèvement sanguin doit se faire à l'aide d'une aiguille assez large pour éviter l'hémolyse et l'activation des plaquettes. Les aiguilles doivent avoir un diamètre de 21-gauge idéalement. Après la veino-ponction, il est important de jeter les premiers millilitres prélevés pour atténuer l'effet de la lésion vasculaire. Quant à la préparation du plasma, elle doit viser à éliminer toutes les cellules et doit se faire dans un délai maximal de deux heures pour limiter l'activation plaquettaire. La préparation consiste en une série de centrifugations à faible vitesse. Puisque les corps apoptotiques (1 à 5µm) sont aussi gros que les plaquettes ($\approx 4\mu\text{m}$), ils ont tendance à être éliminés au cours de cette étape. Pour une conservation à long terme des VEs, le plasma doit être gardé à -80° et décongelé à 37° au moment de l'utilisation. Même si l'idéal serait d'analyser les VEs dans un échantillon frais, un seul cycle de congélation/décongélation ne semble pas affecter leur qualité (78, 95).

1.3.2.2. Méthode de purification des VEs

Bien que le plasma exempt de plaquettes soit théoriquement dépourvu de cellules, sa composition reste quand même complexe. En plus de VEs, il contient des protéines, des lipoprotéines et divers autres éléments qui peuvent interférer avec l'analyse de ces vésicules. C'est pourquoi plusieurs méthodes de purification et de concentration peuvent être utilisées pour une meilleure détection et caractérisation des VEs (78). La plus utilisée est la centrifugation différentielle qui consiste à précipiter les VEs en fonction de leur taille. Les corps apoptotiques sont exclus lors de l'élimination des cellules et des plaquettes par des centrifugations à faible vitesse. Par exemple à 3200 x g les plaquettes et corps apoptotiques sédimentent au fond du tube. Pour précipiter les VEs de plus petites tailles soit les microvésicules, il faut procéder à des

centrifugations d'un minimum entre 10 000 - 20 000 x g. Enfin, l'isolation des exosomes nécessite une ultracentrifugation entre 100 000 – 120 000 x g. Cette méthode d'isolation n'est pas sans inconvénient. En effet, elle provoque l'agrégation des VEs et ne permet pas l'élimination des complexes protéiques, des lipoprotéines et d'autres contaminants (78, 96). D'autres techniques fréquemment utilisées sont la filtration, la centrifugation en gradient de densité, l'immunocapture ou la chromatographie d'exclusion de taille (78). Chaque méthode comporte des avantages et des inconvénients en termes de rendement, durée, niveau de purification ou de faisabilité en milieu clinique. Beaucoup d'efforts ont été déployés pour le développement de techniques plus efficaces et spécifiques que celles déjà citées. L'une des nouvelles méthodes les plus prometteuses est le tri cellulaire induit par fluorescence « *Fluorescence-activated cell sorting* » (FACS) (78). Elle consiste à marquer les VEs avec des anticorps spécifiques couplés à un fluorochrome puis à les trier individuellement en fonction de paramètres prédéterminés tel que l'expression antigénique et la taille.

1.3.2.3. Méthode de caractérisation et de quantification des VEs

L'ISEV a imposé des prérequis nécessaires pour valider l'isolation et la présence des VEs dans le fluide ou tissu étudié (**Tableau 1**) (78). Il faut d'une part mettre en évidence l'expression par les VEs des protéines suivantes : présence d'au moins une protéine membranaire normalement présente sur les cellules et d'une protéine d'origine cytosolique. En cas de purification, il faut prouver l'absence d'éléments spécifiques à des contaminants qui risquent d'être isolés avec les VEs (ApoB ou ApoA pour les lipoprotéines, albumine etc.). D'une autre part, il est nécessaire d'utiliser au moins une technique pour visualiser les VEs et une autre pour évaluer les critères morphologiques, biophysiques ou biochimiques des VEs (78). La microscopie électronique fournit une preuve directe de la présence des VEs et permet de déterminer leur taille et morphologie. De nouvelles technologies ont été développées pour l'évaluation simultanée de la taille et de la concentration des VEs dans un échantillon. Il s'agit notamment du « *nanoparticle tracking analysis* » (NTA) et du « *tunable resistive pulse sensing* » (TRPS). Le NTA est fondé sur l'analyse de la lumière diffusée et du mouvement brownien de chaque particule. Le mouvement brownien se définit comme suit : toute particule en suspension dans un fluide est constamment en mouvement, mais la vitesse de ce mouvement dépend de la taille de cette particule. Ainsi plus la

particule ou la VE est petite, plus son mouvement est vif. En ce qui concerne le TRPS, cette technologie se base sur la mesure de la résistance provoquée par le passage individuel des VEs à travers un pore (96).

La cytométrie en flux reste la méthode la plus utilisée pour la caractérisation quantitative et qualitative des VEs. La cytométrie en flux consiste à faire défiler des cellules ou des particules en suspension à travers un faisceau lumineux. La caractérisation de ces particules dépend de leur capacité à diffracter la lumière incidente et à émettre de la fluorescence. Elle repose plus spécifiquement sur les paramètres suivants : la granularité relative ou la diffusion latérale « *side scatter* » (SSC), la taille relative ou la diffusion vers l'avant « *forward scatter* » (FSC) et l'intensité de la fluorescence (97). L'ajout de marqueurs fluorescents qui pourront se lier aux particules en suspension apporte des informations supplémentaires sur la nature de celles-ci. L'étude des VEs par cytométrie en flux n'a pas toujours été possible. En effet, les cytomètres conventionnels sont habituellement très peu sensibles et permet au mieux la détection de VEs de taille supérieure à 500nm. En revanche, les avancées technologiques des dernières années ont réussi à réduire le seuil de détection et le bruit de fond de ces appareils. On peut désormais détecter des VEs aussi petites que 100 nm (96). Cette nette amélioration de la performance des cytomètres s'explique en partie par une meilleure manipulation de leurs paramètres de configuration. Bien que le FSC soit un indicateur de la taille des cellules, le SSC semble mieux adapter pour l'évaluation de la taille des VEs vu leur faible diamètre (97). Une autre variante serait de détecter le SSC en appliquant un laser de plus faible longueur d'onde que l'original soit le laser violet (405 nm) au lieu du laser bleu (488 nm). On parle alors de la détection du « *violet-SSC* » ou V-SSC. C'est d'ailleurs la configuration adoptée dans notre étude et qui sera détaillé par la suite (98). De plus, l'utilisation de billes micrométriques de référence pour la calibration de l'appareil, l'estimation de la taille et la quantification des VEs facilite l'analyse de ces nano vésicules tout en réduisant la variabilité inter laboratoire (99). De façon générale, la détection des VEs par cytométrie en flux repose sur la taille des événements détectés et leur fluorescence. Cette fluorescence provient d'un marqueur général des VEs et de marqueurs spécifiques aux sous-types cellulaires (**Tableau 2**). En plus des marqueurs de surfaces, des colorants fluorescents tels que la calcéïne et le carboxyfluorescéine ester diacétate de succinimidyle (CFSE) sont très utilisés pour marquer la

totalité des VEs. Ces molécules non-fluorescentes à la base vont diffuser à l'intérieur des VEs où elles seront clivées par des enzymes endogènes les rendant fluorescentes et imperméables. En théorie, elles permettent de révéler les VEs intactes (78).

Tableau 1 : Exigences relatives à la caractérisation des VEs selon les recommandations de l'ISEV 2018 (non exhaustives)

Catégorie des protéines à analyser			Technique à utiliser
Protéine ou GP associée à la membrane cellulaire ou de l'endosome	Protéine cytosolique retrouvée dans les VEs	Composante principale de structure isolée avec les VEs	
Non spécifique à un tissu :	TSG101	Lipoprotéines (Apo A ou ApoB)	Au moins une technique de chaque catégorie ■ Technique d'imagerie : EM, cryo-EM etc. ■ Analyse de particules : Cytométrie en flux, NTA, TRPS etc.
Tétraspansines (CD63, CD81, etc.)	ALIX	Albumine	
CMH classe I	Flottiline 1 -2	Protéine ribosomale	
Intégrine			
Spécifique à un tissu/cellule :	Cavéoline	Agrégats d'acide nucléique	
CD31 (CE), CD235a (GR), CD41 ou CD42a (PLT), CD14 (monocyte) etc.	<i>Heat shock proteins</i> (HSP)		

GP : Glycoprotéine ; VEs : Vésicules extracellulaires ; CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité ; CE : Cellule endothéliale ; GR : Globule rouge ; PLT : plaquette ; Apo : Apolipoprotéine ; EM : microscopie électronique ; NTA : *Nanoparticle tracking analysis* ; TRPS : *tunable resistive pulse sensing*

1.3.3. Vésicules extracellulaires et athérosclérose

Les plaques d'athérome sont le siège d'activation et de mort cellulaire excessives. Ces réactions exagérées se traduisent par une libération et une accumulation de VEs dans la plaque. Loin d'être inertes, ces VEs participent activement au développement de l'athérosclérose formant ainsi un véritable cercle vicieux.

1.3.3.1. VEs dérivées de plaquettes

Plus de 80 % des VEs présentes dans la circulation sanguine sont d'origine plaquettaire (89). L'expression des marqueurs plaquettaires par les VEs PLT varient en fonction de l'état de la cellule d'origine au moment de la libération. En effet, toutes les VEs dérivées des plaquettes expriment les marqueurs constitutifs de ce type cellulaire (CD41, CD42b, CD61 ou CLEC-2), mais seulement celles qui sont sécrétées par des plaquettes activées portent à leur surface des marqueurs d'activation plaquettaire (CD62p et CD63) (100, 101). Les VEs PLT présentent également à leur

surface d'autres protéines telles que le facteur de von Willebrand (vWF) et CD31. Cependant, ces protéines ne sont pas exclusives aux plaquettes (102). Les VEs de PLT participent à la progression de l'athérosclérose dès ses premiers stades. En cas de lésion ou dysfonction endothéliale, il y a activation puis agrégation plaquettaire accompagnée de la libération de VEs PLT au niveau de l'endothélium endommagé. Ces VEs induisent l'apoptose des cellules endothéliales en leur transférant la caspase-3, enzyme associée à la mort cellulaire, ce qui altère la perméabilité vasculaire et favorise l'infiltration de l'oxLDL(103, 104). De plus, il a été démontré que les VEs PLT facilitent l'adhésion des monocytes à l'endothélium en augmentant l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales (105). Ils contribuent également à la prolifération des CML (106). Les VEs PLT sont surtout reconnues pour leur activité pro-coagulante qui est 50 à 100 % supérieure à celle des plaquettes activées(107). Ce fort potentiel thrombotique est lié à l'expression de la PS et du facteur tissulaire (FT) par ces vésicules (108). Les VEs PLT semblent être associées à une forte incidence d'évènements thrombotiques et d'athérosclérose puisque les concentrations de VEs PLT en circulation sont corrélées à l'activation plaquettaire (109). De plus, les taux de VEs PLT sont augmentés de façon significative chez les sujets présentant des facteurs de risque de MCV dont l'HTA, le diabète, la dyslipidémie et l'obésité (102).

1.3.3.2. VEs dérivées des globules rouges

Les globules rouges ont une durée de vie de 120 jours durant laquelle ils perdent environ 20 % de leur volume par émission de VEs. Ce phénomène de vésiculation s'avère utile pour l'élimination d'agents nocifs, comme l'hémoglobine (Hb) dénaturée, qui risquent de s'accumuler dans les globules rouges (110). Les VEs dérivées de globules rouges (VEs GR) sont identifiées par un marqueur de membrane appelé la glycophorine A ou CD235a, exclusif aux globules rouges (111). Elles favorisent le développement de l'athérosclérose par plusieurs mécanismes. Des études faites sur des unités de sang stockées ont démontré que les VEs GR transportent une grande quantité d'Hb libre capable de séquestrer le NO (112). En inhibant les fonctions antiathérogènes du NO, les VEs GR contribuent alors à l'installation d'une dysfonction endothéliale, étape clé de l'athérosclérose (26, 112). De plus, les VEs GR participent à l'équilibre du système de coagulation. Elles présentent d'un côté des activités fibrinolytiques *in vitro* en favorisant l'activation du plasminogène, acteur final de la fibrinolyse (113). D'un autre côté, elles sont connues pour

déclencher la formation de thrombine grâce à l'expression de la PS et du FT et par activation du facteur XII qui initie la voie intrinsèque de la coagulation (108). Les taux de VEs GR en circulation sont augmentés dans les pathologies qui affectent directement les globules rouges (paludisme, drépanocytose etc.) mais également en cas de dyslipidémie (114) (115).

1.3.3.3. VEs dérivées de cellule endothéliale

Les cellules endothéliales libèrent des VEs en réponse à un stimulus apoptotique ou une activation cellulaire. De ce fait, elles constituent un marqueur émergent de la dysfonction endothéliale (116). Elles sont difficiles à détecter dans la circulation sanguine parce qu'elles sont peu abondantes et expriment très faiblement les marqueurs endothéliaux. Le CD144 (aussi appelé VE-cadhérine) est un exemple de marqueur très spécifique des VEs dérivées des cellules endothéliales (VEs CE) mais sa faible sensibilité entrave son utilisation optimale (97). La molécule d'adhésion E-selectine ou CD62e est très utilisée pour la détection des VEs CE vu sa grande spécificité, mais son expression se limite aux vésicules libérées par des cellules activées. D'autres marqueurs endothéliaux tel que le CD31 ou le CD105 ne sont pas exclusifs aux VEs CE. Face à ces contraintes, plusieurs stratégies ont été proposées pour la détection des VEs CE : la combinaison de deux marqueurs endothéliaux pour améliorer la sensibilité (CD144⁺CD105⁺ ; CD146⁺CD105⁺) ou l'association d'un marqueur endothélial peu spécifique à un marqueur non endothélial pour augmenter la spécificité (CD31⁺/CD41⁻ ; CD31⁺/CD42b⁻ ; CD105⁺/CD45⁻) (97). Des études démontrent que les conditions connues pour altérer la paroi vasculaire provoquent une augmentation du taux de VEs CE en circulation à citer l'athérosclérose, la dyslipidémie, le diabète et l'obésité (117). Une étude prospective effectuée sur 350 patients confirme que les VEs CE (CD144⁺) sont des prédicteurs indépendants de la survenue d'évènements cardiovasculaires chez les sujets à haut risque (118). Mis à part leur rôle dans la prédiction des MCV, les VEs CE participent à la progression de l'athérosclérose. Certaines de ces vésicules renferment des MMP qui vont dégrader la matrice extracellulaire et favoriser la migration des CML pour aboutir à la formation de la chape fibreuse (119). Elles réduisent de plus la production de NO par les cellules endothéliales et augmentent le stress oxydatif (120).

1.3.3.4. VEs dérivées des leucocytes

Une grande majorité des VEs retrouvées dans la plaque d'athérosclérose sont dérivées de leucocytes et en particulier de macrophages mais cette tendance ne s'observe pas dans la circulation sanguine. En effet, les VEs dérivées des leucocytes (VEs Leuco) sont rares en circulation et difficilement détectables (121). Le marqueur pan-leucocytaire CD45, est régulièrement utilisé pour l'identification des VEs Leuco, mais sa faible expression affecte sa sensibilité (97). Pour l'étude des sous-populations des VEs Leuco, d'autres marqueurs sont associés au CD45. Par exemple celles dérivées des monocytes sont normalement définies comme étant CD45⁺ CD14⁺. Les VEs produites par les lymphocytes T sont CD45⁺ CD3⁺ et celles produites par les lymphocytes B sont CD45⁺ CD19⁺ (122). Dans l'athérosclérose, les VEs Leuco stimulent la sécrétion de cytokines proinflammatoires et l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales (123). L'augmentation de la concentration plasmatique des VEs Leuco indique la présence d'athérosclérose et de réactions immunitaires massives qui l'accompagne. La quantification des sous-populations de VEs Leuco peut s'avérer tout aussi intéressante et utile. En effet, des études montrent que le taux de VEs CD45⁺CD3⁺ semblent prédire la survenue d'événements cardiovasculaires (120). Au niveau fonctionnel, les VEs dérivées des lymphocytes T sont capables d'activer les monocytes pour produire des cytokines. Quant aux VEs produites par les monocytes, elles expriment le FT à leur surface, activant ainsi la cascade coagulation (123).

Origine cellulaire des VEs	Marqueur		Rôle dans l'athérosclérose	Référence
	Constitutive	Activation		
VEs PLT	CD41 CD42b CD61	CD62p CD63	- Coagulation - Apoptose des CE - Adhésion des monocytes	(97, 100, 103, 105)
VEs GR	CD235a		- Coagulation - Séquestration du NO	(97, 108, 112)
VEs CE	CD144 CD146 CD105 CD31	CD62e	- Dysfonction endothéliale - Dégradation de la matrice extracellulaire - Augmentation de ROS - Diminution du NO	(97, 119, 120)
VEs Leuco	CD45		- Coagulation	(97, 122, 123)
- Monocyte	CD14		- Activation des monocytes	
- Lymphocyte T	CD3		- Activation des CE	
- Lymphocyte B	CD19			

VEs : vésicules extracellulaires ; PLT : plaquette ; GR : globule rouge ; CE : cellule endothéliale ; Leuco : Leucocyte ; NO : oxyde nitrique ; ROS : espèce réactive de l'oxygène

Tableau 2 : Rôle des différents sous-types de vésicules extracellulaires dans l'athérosclérose

1.3.4. Vésicules extracellulaires dans la lymphe

Une fois libérées dans l'espace extracellulaire, les VEs se retrouvent dans les différents fluides biologiques. Elles sont notamment présentes dans la lymphe comme nous l'avons déjà démontré, et à des taux plus élevés en cas d'athérosclérose (80). Les VEs sont même capables d'interagir avec les CEL. En effet, des tests cellulaires effectués dans notre laboratoire prouvent que les VEs GR et VEs PLT sont rapidement internalisées par les CEL (**Figure 4A-B**). Nous avons aussi prouvé que les VEs GR induisent une augmentation de la production de ROS par les CEL alors que les VEs PLT, au contraire, réduisent le stress oxydatif (**Figure 4C**)(124). Ces observations suggèrent que les VEs PLT ont un effet protecteur sur l'endothélium lymphatique, contrairement aux VEs GR.

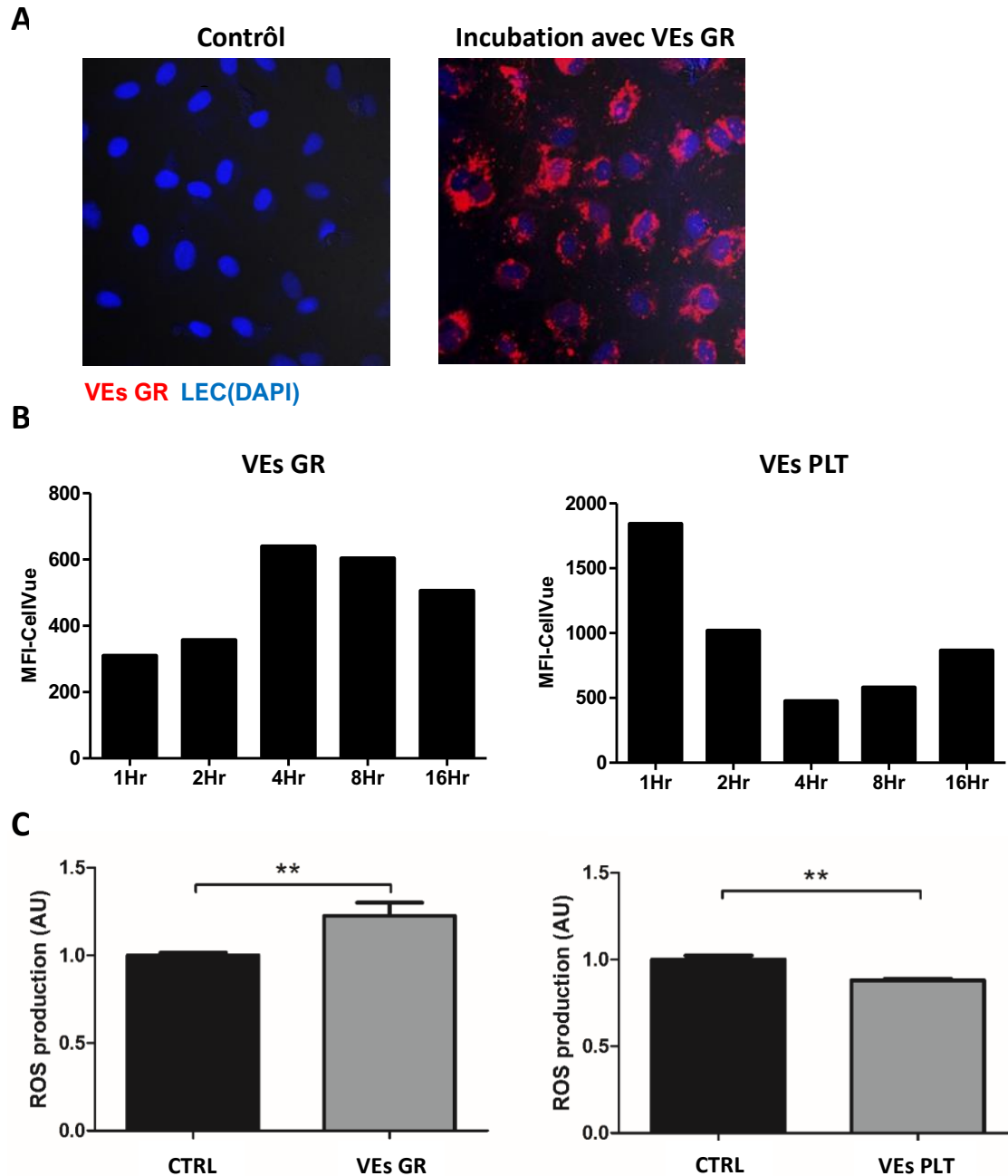


Figure 4. Les VEs de plaquettes et de globules rouges interagissent avec les cellules endothéliales lymphatiques.

(A) Images de CEL seules (à droite) ou incubées pendant 16 heures avec des VEs GR (à gauche), obtenues au microscope à fluorescence (Bleu : Dapi ; Rouge : VEs). (B) Cinétique d'internalisation des VEs GR (à droite) et VEs PLT (à gauche) marquées au CellVue par les CEL. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (BD, FACSCelesta) et les résultats sont exprimés par moyenne d'intensité de fluorescence du CellVue. (C) Quantification de la production de ROS par les CEL en présence de VEs GR (à gauche) ou VEs PLT (à droite) par marquage avec le CMH2DCF-DA (2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacétate) ; ** $p < 0,01$.

Chapitre 2 : Hypothèse et objectif de l'étude

2.1. Résumé des connaissances sur le sujet

- L'athérosclérose est une condition inflammatoire chronique caractérisée par l'accumulation de cholestérol dans la paroi des vaisseaux sanguins et une réaction immunitaire exacerbée.
- Les facteurs de risque traditionnels sont : âge, sexe, histoire familiale de MCV prématurée, diabète, HTA, dyslipidémie, tabagisme, obésité et sédentarité.
- Le système lymphatique participe à la mobilisation du cholestérol hors de la lésion d'athérome et à son transport jusqu'au système sanguin pour être éliminé par le foie.
- Les études chez la souris prouvent que la dysfonction lymphatique précède le développement de l'athérosclérose et que cette dysfonction touche a priori la capacité de propulsion des vaisseaux collecteurs.
- Les mécanismes à l'origine de cette dysfonction ne sont toujours pas élucidés, mais il est fort probable que des constituants de la lymphe puissent affecter la capacité de transport des vaisseaux lymphatiques.
- Les vésicules extracellulaires (VEs) sont des particules libérées par la cellule qui se caractérisent par une bicouche lipidique et l'absence de noyau. Elles sont considérées comme biomarqueur potentiel de plusieurs pathologies comme l'athérosclérose et participe même à leurs progressions.
- Les VEs sont présentes dans la lymphe et leurs concentrations sont augmentées en condition d'athérosclérose.
- Les VEs interagissent avec l'endothélium lymphatique et provoquent des effets différentiels en fonction de leur origine cellulaire. En effet, les VEs dérivées des globules rouges sont néfastes alors que celles produites par les plaquettes sont protectrices.

2.2. Hypothèse et objectifs de l'étude

Nous avons émis l'hypothèse que **les VEs contribuent à la dysfonction lymphatique reliée à l'athérosclérose**. Dans l'objectif de traduire nos découvertes fondamentales en applications cliniques au bénéfice des patients, nous avons mis en place un projet translationnel qui vise à étudier cette hypothèse. Ce projet a pour objectif de confirmer la présence d'une dysfonction lymphatique chez les humains avant même l'apparition de l'athérosclérose et d'évaluer le potentiel des VEs plasmatiques en tant que biomarqueurs précoces de cette dysfonction. Par conséquent, nous avons inclus dans notre étude deux groupes de sujets sains qui se distinguent par leur risque de développer l'athérosclérose. Ainsi nous avons sélectionné des sujets sains qui présentent ou non une histoire familiale de MCV prématurée chez un parent du premier degré, puisque ce facteur de risque augmente les chances de survenue de MCV de 60 à 75 % chez des individus, même en apparence sains. Le suivi de ces patients se fera ultimement pendant cinq (5) ans. Il était important de s'assurer que tous les participants ne présentent pas de maladies métaboliques qui risquent d'altérer les paramètres à étudier. Afin de répondre à notre objectif global, nous avons élaboré les quatre (4) sous-objectifs suivants :

- Effectuer le dosage de biomarqueurs dit "classiques" en clinique associés à l'athérosclérose dans le sérum des sujets
- Optimiser un protocole pour la détection des VEs afin de quantifier les VEs plasmatiques
- Mettre au point une méthode d'imagerie de la fonction lymphatique par proche infrarouge et analyser des paramètres de contraction des vaisseaux lymphatiques
- Identifier les effets différentiels des VEs plasmatiques isolées de chaque groupe de patient sur une couche de cellules endothéliales en culture.

La comparaison de ces paramètres entre les deux groupes permettra de vérifier s'il existe un profil de VEs permettant de discriminer les sujets qui ont un risque plus élevé de MCV ainsi que d'évaluer le rôle de la dysfonction lymphatique dans le développement de l'athérosclérose. Ultimement, ces paramètres seront associés au risque polygénique de développer une maladie cardiovasculaire. Les résultats présentés dans ce mémoire sont préliminaires et reflètent les données recueillies pour la première année de l'étude.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3.1. Recrutement des participants

Cette étude est menée au Centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal (ICM). Elle fait partie d'un protocole qui a été approuvé par le comité éthique de l'ICM et se déroule conformément aux principes de la Déclaration d'Helsinki. Les participants recrutés sont des sujets sains, âgés entre 18 et 60 ans. Ils ont été sélectionnés selon des critères d'inclusions et d'exclusions strictes afin de garantir la validité des résultats (**Tableau 3**). Le critère d'inclusion principal est l'absence de maladie coronarienne prouvée par une mesure du score calcique, une angiographie coronarienne ou par scintigraphie de perfusion myocardique. Les critères d'inclusion comportent toutes conditions connues pour altérer la fonction lymphatique et/ou le taux de VEs en circulation (125, 126). Les sujets qui répondent à ces exigences sont ensuite assignés à l'un des deux groupes de l'étude selon la présence ou l'absence d'histoire familiale de MCV prématurées chez un parent du 1^{er} degré (avant l'âge de 55 ans chez le père ou avant 65 ans chez la mère). Ces groupes seront désignés de la façon suivante : groupe contrôle ou CTRL (sans antécédent familiaux de MCV) et groupe ATCD (groupe avec antécédent familiaux de MCV). L'objectif est de recruter 30 patients pour le groupe CTRL et 20 patients pour le groupe ATCD. Les caractéristiques des participants déjà sélectionnés pour l'étude sont résumées dans le **tableau 4**.

	Groupe CTRL	Groupe ATCD
Critères d'inclusion	<p>Absence de preuve de maladie coronarienne[‡]</p> <p>Absence d'antécédents familiaux de MCV prématurées[†]</p>	<p>Absence de preuve de maladie coronarienne[‡]</p> <p>Présence d'antécédents familiaux de MCV prématurées[†]</p>
Critères d'exclusion	<ul style="list-style-type: none"> • Lymphoedème* primaire ou secondaire • Histoire de maladie vasculaire artérielle ou veineuse • Insuffisance rénale • Insuffisance cardiaque et/ou fraction d'éjection ventriculaire gauche ≤ 40% • Tabagisme dans les 10 dernières années • Hypertension artérielle définit par une pression artérielle systolique ≥140 mmHg et/ou diastolique ≥ 90 mmHg et/ou traitement anti-hypertenseur • Diabète mellitus (type 1 ou 2) • Hypercholestérolémie définit par des taux LDL-C > 3,5 mmol/L et/ou traitement hypolipémiant) • Allergie à l'iode ou aux poissons/fruits de mer** 	

‡ Prouvée par mesure du score calcique, angiographie coronarienne ou scintigraphie de perfusion myocardique

† Maladie cardiovasculaire chez un parent du 1^{er} degré (Père < 55ans ; Mère < 65ans)

*Condition causée par une anomalie ou une destruction du système lymphatique résultant en une accumulation de fluide riche en protéine et le gonflement des membres (73)

**Pour prévenir les réactions allergiques au vert indocyanine (ICG)(127, 128)

Tableau 3 : Critères d'inclusion et d'exclusion de l'étude

3.2. Déroulement de l'étude

L'étude s'étend sur une période de 5 ans durant laquelle les participants devront se présenter pour des visites annuelles. Après avoir recueilli le consentement éclairé du sujet, chaque visite comporte un examen et un questionnaire médical, un prélèvement sanguin et une imagerie de la fonction lymphatique. Le questionnaire médical contient des questions sur les antécédents médicaux, l'histoire familiale et la prise de médicaments.

3.3. Préparation des échantillons

Le sang est prélevé à partir de la veine antécubitale dans des tubes pour sérum ou des tubes contenant du citrate de sodium 3.2 % ou 1.8 mg/mL K₂EDTA, grâce à des aiguilles 21 gauges.

Conformément aux recommandations de l'ISEV, les premiers millilitres prélevés sont toujours éliminés et les échantillons sont centrifugés dans un délai maximal de 2 heures après le prélèvement. Les tubes citratés destinés à l'étude des VEs sont acheminés sur glace et sont centrifugés en deux temps pour obtenir du plasma sans plaquettes « *platelet-free plasma* » (PFP). La première centrifugation se fait à 2500g pendant 20 minutes pour éliminer les cellules sanguines. Le surnageant est ensuite récupéré et centrifugé de nouveau à 3200g durant 5 minutes afin de précipiter les plaquettes et cellules résiduelles. Le PFP (surnageant) ainsi obtenu est transféré dans un second tube en s'assurant de ne pas récupérer le culot (**Figure 4**). Pour l'isolation du sérum, les tubes sont incubés à température ambiante pendant 30 minutes, le temps que le sang coagule totalement. Ces tubes sont ensuite centrifugés à 1800g pendant 15 minutes. Le sérum et le PFP sont aliquotés et conservés à -80°C. Au besoin, les échantillons sont décongelés à 37°C directement avant de procéder à l'analyse. Toutes les centrifugations sont faites à 4°C, sans freins.

3.4. Stratégie de marquage des VEs dans le plasma

3.4.1. Panel des anticorps

Les anticorps utilisés proviennent de BD Biosciences (San Jose, CA, USA) : CD45-V500 (clone HI30, #560777), CD235a-BV736 (clone GA-R2 (HIR2), #740984), CD16 PerCP-Cy5.5 (clone 3G8, #560717), CD31 APC-Cy7 (clone WM59, #563653), CD41a APC (clone HIP8, #561852), CD19 AF700 (clone HIB19, #561031), CMHI-BV650 (clone G46-2.6, #740581), CMHI-PE (clone G46-2.6, #555553) et Annexine V BV650 (#563974) ; de BioLegend (San Diego, CA, USA) : CD3 APC (clone UCHT1, #300411), CLEC-2 APC (clone AYP1, #372005), CD41 PerCP-Cy5.5 (clone HIP8, #133917), Podoplanine PerCP-Cy5.5 (clone NC-08, #337011), VEGFR-3 PE (clone 9D9F9, #356203), CD14 V650 (clone M5E2, #301835) ; et LYVE-1 APC (Polyclonale, #PA5-22782, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). La concentration des anticorps a été déterminée par des essais de titration en privilégiant les concentrations qui garantissent le meilleur signal/bruit. La stratégie de marquage des différentes sous-populations des VEs en circulations est résumée dans la **Figure 5**.

VEs GR	VEs PLT	VEs monocyte	VEs CPM	VEs LyT	VEs LyB	VEs CEL	VEs CEV
CFSE ⁺							
CD235a ⁺	CD41a ⁺	CD45 ⁺	CD45 ⁺	CD45 ⁺	CD45 ⁺	CD41a ⁻	CD41a ⁻
	CLEC2 ⁺	CD14 ^{+/-}	CD14 ⁺	CD3 ⁺	CD19 ⁺	CD31 ⁺	CD31 ⁺
		CD16 ^{+/-}	LYVE1 ⁺			PDPN ⁺	PDPN ⁻
						VEGFR-3 ⁺	VEGFR-3 ^{low}

Figure 5. Stratégie de marquage des sous-populations de VEs.

CMH-I : Complexe majeur d'histocompatibilité ; VEs : vésicules extracellulaires ; GR : globule rouge ; PLT : plaquette ; CPM : cellule progénitrice myéloïde ; Ly : Lymphocyte ; CEL : cellule endothéliale lymphatique ; CEV : cellule endothéliale vasculaire

3.4.2. Marquages des VEs

L'analyse des VEs par cytométrie en flux nécessite de très faible volume de plasma marqué pour éviter le « *swarm effect* ». Cet effet est observé lorsque plusieurs vésicules sont ciblées en même temps par le faisceau lumineux et sont alors comptées comme un seul évènement/une seule VE (129). Le volume idéal à marquer est déterminé par des essais de dilutions du plasma. Les tests effectués dans notre laboratoire suggèrent qu'un volume de 10µL de PFP permet d'avoir un bon signal tout en évitant le « *swarm effect* ». Ces 10µL de PFP sont incubés pendant 30 minutes à 37°C à l'abri de la lumière avec 1µM CFSE (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) et l'un des quatre mélanges d'anticorps. Chaque mélange d'anticorps est dirigé contre des sous-populations de VEs en particulier et filtré (0,22µm) avant d'être ajouté au PFP. Il s'agit d'une filtration par centrifugation (Ultrafree-MC Centrifugal Filter #UFC30GV00, Millipore sigma, Burlington, MA, USA) à 10 000g pendant 1 minute pour éliminer les agrégats d'anticorps (130). Le marquage se fait dans un volume total de 200µL d'une solution tampon Annexine V (AV buffer) filtrée (0,45µm) (10 mM Hepes pH 7.4, 140 mM NaCl, et 2.5 mM CaCl₂) contenant 10 µM D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone (PPACK)(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) qui est un anticoagulant. L'AV buffer assure un apport de calcium nécessaire pour la fixation de l'Annexine V à la PS exprimée par les VEs mais peut induire la coagulation de l'échantillon d'où l'ajout du PPACK. À la fin de l'incubation, la réaction est arrêtée en ajoutant 200µL d'AV buffer aux échantillons, qui sont ensuite conservés sur glace et à l'obscurité en attendant d'être analysés. Pour la quantification

des VEs, 5µL de billes de comptage (CB) (MP-Count Beads, suspension de billes fluorescentes en PE de 3µm de diamètre, #7804, Biocytex, Marseille, France), sont ajoutées à chaque tube juste avant l'acquisition.

3.4.3. Les tubes contrôles

Pour confirmer l'origine vésiculaire des événements détectés, certains échantillons sont traités avec 0,05 % de Triton X-100 après l'arrêt de la réaction et incubés pendant 30 minutes à température pièce. Le Triton X-100 est un détergent connu pour solubiliser les VEs et sert de contrôle. La spécificité du marquage et le choix des voltages ont été évalués grâce aux contrôles suivants :

- Contrôles négatifs non marqués « *unstained* » pour détecter l'auto-fluorescence de l'échantillon
- Mélanges d'anticorps seulement (non incubés avec du PFP), pour éliminer la contamination par le bruit de fond.
- PFP marqué avec un seul anticorps « *single stain* » qui permet d'ajuster les voltages et d'appliquer les bonnes compensations.
- « *Fluorescence minus one* » (FMO) consiste à marquer le PFP avec tous les anticorps du mélange sauf un seul. Cette technique permet de vérifier la spécificité du marquage et de distinguer les populations positives et négatives pour ce marqueur.

3.5. Configuration du cytomètre en flux

Toutes les acquisitions sont faites sur un BD FACSCelesta (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) muni de 3 lasers : le laser bleu 20mW (488nm), le laser rouge 40mW (640nm) et le laser violet 50mW (405nm). Il a une configuration BVR12 (4 Bleu/3 Rouge/5 Violet) ce qui lui confère la capacité d'analyser jusqu'à 12 paramètres/couleurs en même temps. Le détecteur du FSC (diffusion vers l'avant) est une photodiode avec un filtre passe-bande de 488/10 alors que le détecteur du SSC, à l'état basal, (diffusion latérale) est un photomultiplicateur (PMT) avec un filtre passe-bande 488/10. L'appareil est calibré au début de chaque analyse avec des billes « *Cytometer Setup & Tracking* » (CST) (BD FACSDiva CS&T Research Beads, BD Biosciences) dans ces conditions. Par

contre, pour l'analyse des VEs, le filtre passe-bande 450/40 (BV421 du laser violet) est manuellement remplacé, après la calibration par les CST, par un filtre passe-bande 405/10 de 1 mm d'épaisseur pulvérisé par magnétron (Chroma Technology, Bellows Falls, VT, USA) (**Figure 5**). Ce changement de filtre permet de détecter le SSC en utilisant le laser violet à la place du laser bleu, ce qui confère une meilleure résolution pour la détection de la granularité de ces petites particules. Ce paramètre sera désigné par V-SSC (violet-SSC) pour la suite du mémoire. Le signal induit par le passage d'une cellule devant le faisceau lumineux se présente sous forme d'un pic caractérisé par sa hauteur (-H), sa largeur (-W) et son aire (-A). Les paramètres sont normalement représentés en -A pour les cellules. Vu la taille réduite des VEs et leur faible intensité de fluorescence, les histogrammes et les graphiques en nuage « *dot plot* » sont affichés en fonction de la hauteur du pic (indiquée par -H) pour permettre une détection optimale du signal.

Un mélange de billes de silice non fluorescentes (180, 240, 300, 590, 880, et 1300 nm) et de billes de latex fluorescentes en FITC (110 et 500 nm) appelé Apogee Mix (#1493, Apogee Flow Systems, Hemel Hempstead, UK) permet l'optimisation des signaux de fluorescence et la standardisation des résultats pour l'étude des VEs. Les voltages du PMT sont maintenus tout au long des analyses après avoir été ajustés au départ à l'aide des contrôles déjà cités. Le seuil de détection ou « *threshold* » est réglé à la plus faible valeur possible soit 200V. Il définit le plus faible niveau de FSC pour qu'une particule soit détectée et acquise par le cytomètre. Au moment de l'analyse des VEs, le débit d'acquisition est réglé au plus faible, 12µL/minutes pour éviter le « *swarm effect* » ce qui assure une vitesse d'acquisition ne dépassant pas les 1000 évènements/seconde. La durée d'acquisition varie en fonction de l'abondance des VEs analysées dans la circulation. Pour l'analyse des VEs GR et PLT, VEs les plus abondantes en circulation, l'acquisition se fait pendant 2 minutes. Quant aux VEs de leuco et VEs de CE, la durée d'acquisition est de 3 et 4 minutes, respectivement.

3.6. Analyse des vésicules extracellulaires

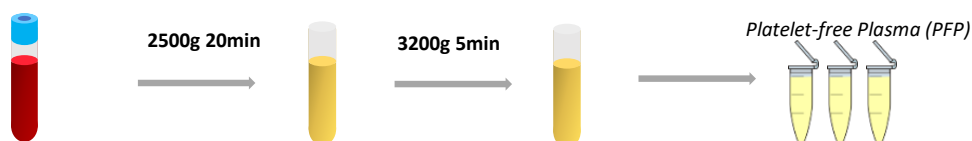
À la fin de l'acquisition, les fichiers FCS3.1 sont exportés et analysés sur FlowJo v10.5 (Flowjo, Ashland, OR, USA) (**Figure 6**). Les spectres d'émission des divers fluorochromes ont tendance à se chevaucher à des degrés variables ce qui affecte la précision des résultats. Par exemple, un signal

FITC peut être détecté dans le canal PE et vice versa. Les fuites optiques de fluorescence dans le mauvais canal sont alors corrigées par les matrices de compensation. Pour chaque mélange d'anticorps, un modèle de fichier d'analyse et de matrice de compensation ont été créés pour la standardisation de l'analyse des VEs d'un échantillon à un autre. Le nombre absolu de VEs dans le PFP est calculé en fonction de la formule suivante (131):

$$\text{VEs/mL} = \left(\frac{\# \text{ d'évènements dans la région d'intérêt de VEs}}{\# \text{ d'évènements dans la région d'intérêt CB}} \right) \times \left(\frac{\# \text{ total de billes dans échantillon}}{\text{Volume échantillon}} \right) \times \text{Facteur de dilution} \times 1000$$

Pour chaque région d'intérêt, le nombre d'évènements détectés dans l'échantillon contenant uniquement les anticorps (background) est soustrait des valeurs obtenues avec les échantillons de PFP.

1. Centrifugation



2. Marquage

10µL PFP
+ Mélange
d'anticorps
+ CFSE



30min d'incubation
à 37°

3. Acquisition par cytométrie en flux



4. Analyse des résultats

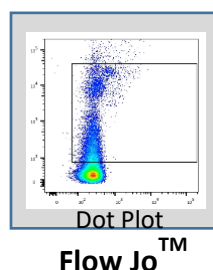


Figure 6. Les étapes de l'analyse des vésicules extracellulaires par cytométrie en flux.

3.7. Triage des vésicules extracellulaires

Pour l'analyse de taille des VEs, le PFP (1000µL) est marqué au CFSE, tel qu'indiqué précédemment, puis filtré sur tamis cellulaire avec pores de 70µm. Les événements qui sont CFSE⁺ et qui tombent dans la région d'intérêt VEs prédéfinie par l'Apogee Mix sont triés grâce au cytomètre en flux FACSAria Fusion équipé d'un filtre passe-bande 405/10 pour la détection du V-SSC, tel que décrit précédemment, et d'un PMT pour la détection du FSC. Les événements ainsi triés représentent la totalité des VEs contenus dans l'échantillon.

3.8. Analyse de la taille par NTA

La mesure de la taille des VEs triées est effectuée grâce à un appareil à NTA, le NanoSight LM10 doté d'un laser de 642 nm (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK), en utilisant la version 2.3 du logiciel. Une dilution est requise pour les échantillons les plus concentrés afin d'assurer la détection optimale de toutes les particules. Cinq vidéos d'une durée d'une minute sont enregistrées par échantillons avec les paramètres suivant : niveau de la caméra 10, gain 10 et le seuil de détection (*threshold*) à 4.

3.9. Analyse des monocytes du sang

Un total de 1800µL d'une solution de lyse 1X (« *Red blood cell Lysis Buffer* » ; BioLegend, San Diego, CA, USA) a été ajouté à 100µL de sang total (EDTA). Après une incubation de 12 minutes à température pièce et à l'abri de la lumière, un tampon « FACS Buffer » (PBS 5% BSA, 0.1% Azoture de sodium) a été ajouté aux cellules pour arrêter la réaction. Le mélange est centrifugé pendant 5 minutes à 500 g. Le surnageant est éliminé et le culot de cellules est resuspendu dans 500µL de FACS Buffer. Avant le marquage, les échantillons sont centrifugés à 500g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré pour ne garder que le culot au fond du tube. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 25µL de FACS Buffer dans lequel des anticorps couplés à des fluorochromes ont été dilués pour marquer les monocytes. Les anticorps utilisés sont les suivants : CMHI-APC (clone G46-2.6, #555555) et CD16-PerCP Cy5.5 (clone 3G8, #560717) proviennent de BD Biosciences (San Jose, CA, USA) et CD14-BV605 (clone M5E2, #301833) de BioLegend (San Diego, CA, USA). Les échantillons sont incubés pendant 10 minutes sur glace à l'abri de la lumière. La

réaction est ensuite arrêtée par l'ajout de 500µL de FACS Buffer. L'étape suivante consiste à centrifuger les tubes à 500g pendant 5 minutes à 4°C, éliminer le surnageant, resuspendre les cellules avec 200µL de FACS Buffer puis transférer dans des tubes de propylène pour FACS. Il faut garder ces tubes sur glace à l'abri de la lumière. Avant la lecture au BDFACS Celesta, le DAPI est ajouté à une concentration finale de 100nM dans chaque tube. À partir des populations DAPI⁻ CMH-I⁺, les monocytes ont été identifiés comme étant CD14^{High}CD16⁻ pour les classiques, CD14^{High}CD16⁺ pour les intermédiaires et CD14^{Low}CD16⁺ pour les non-classiques.

3.10. Mesure des cytokines inflammatoires

Les cytokines inflammatoires (IL-12p70, TNF-α, IL-6, IL-10, IL-8 et IL-1b) sont mesurées à partir du sérum (50µL) par la technique « *Cytometric Bead Array* » (CBA) (BD™ Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokine Kit, BD Biosciences). Cette méthode repose sur l'utilisation de 6 populations de billes avec une intensité de fluorescence distincte, recouvertes d'anticorps spécifiques aux cytokines à doser. Une fois la liaison bille-cytokine établie, un anticorps de détection fluorescent en PE est ajouté pour se fixer aux cytokines, formant un complexe sandwich. Après acquisition, l'analyse des échantillons se fait sur le logiciel FCAP Array (BD Biosciences). L'intensité du signal PE est proportionnelle à la concentration de cytokines liées. La concentration de cytokines dosées dans chaque échantillon est ainsi calculée en pg/mL.

3.11. Analyse de la fonction lymphatique

3.11.1. Imagerie de la fonction lymphatique

L'imagerie de la fonction lymphatique repose sur la fluorescence du vert d'indocyanine (ICG) dans le proche infra-rouge « *near-infrared* » (NIR). La solution d'ICG reconstituée (100µL) (Akorn, Lake Forest, IL, USA) est injectée dans le derme de la face dorsale de la main (**Figure 7**). L'apparition d'une papule confirme que l'injection intradermique de l'ICG est correcte. Au niveau du derme, l'ICG se lie à l'albumine pour ensuite être capté par les capillaires lymphatiques et progresser vers les vaisseaux collecteurs où il sera propulsé. Pour procéder à l'imagerie, le site d'injection est recouvert d'un ruban adhésif noir pour ne pas intercepter le signal des zones d'intérêts et le sujet est couché sur son ventre en plaçant le bras où a été faite l'injection sous une diode laser et une

caméra infra-rouge avec capteur CCD. Une fois excité par le rayon laser (785nm), l'ICG émet une fluorescence (830nm) capté par la caméra qui enregistre des vidéos de 8 secondes toutes les 10 secondes sur une durée de 35 minutes.

3.11.2. Analyse des images fluorescentes

Les images obtenues sont transférées et analysées sur Image J via une interface graphique développée avec Matlab. Plusieurs paramètres sont alors calculés pour l'évaluation de la fonction lymphatique. Dans le cadre de ce mémoire, la vitesse de la lymphe et la fréquence et amplitude de contractions des vaisseaux lymphatiques collecteurs sont uniquement étudiés. La vitesse (mm/s) reflète la vitesse à laquelle la lymphe circule dans les vaisseaux collecteurs. Pour le calcul de la vitesse sur Image J, il suffit de choisir deux points sur un vaisseau, de déterminer la distance qui les sépare et de diviser cette distance par le temps nécessaire à l'ICG pour la parcourir. Les autres paramètres sont déterminés à partir des profils d'intensité de fluorescence au niveau d'une région d'intérêt fixe (ROI) sur un vaisseau. Ces profils se caractérisent par une série de pic de fluorescence (contraction des vaisseaux) et creux (relaxation des vaisseaux). La fréquence des contractions (s^{-1}) est définie par le nombre de pics par minute alors que l'amplitude de contraction (% min, max) correspond aux pourcentages de variation moyenne entre le pic et le creux. Ce paramètre reflète la force de contraction des vaisseaux collecteurs.

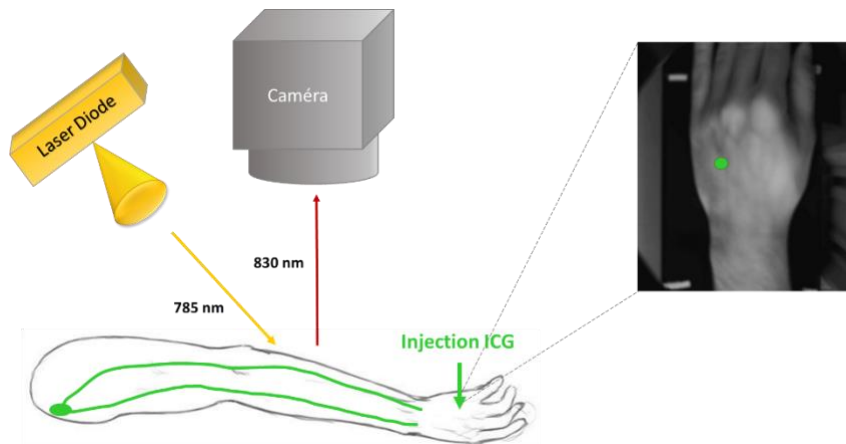


Figure 7. Imagerie des vaisseaux lymphatiques par proche infrarouge après injection intradermique et excitation du vert indocyanine.

3.12. Analyses statistiques

La normalité des échantillons a été testée par le test de normalité D'Agostino-Pearson. Si la distribution est normale, le test statistique utilisé est le test-t de Student, et les résultats présentés sous forme de moyenne \pm erreurs standards à la moyenne (SEM), sauf si précisé autrement. Dans le cas contraire, il s'agit du test non paramétrique de Mann-Whitney. Tous les calculs ont été effectués sur GraphPad Prism v5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Le seuil de signification est fixé à 0,05 ($p < 0,05$).

Chapitre 4 : Résultats

4.1. La configuration du cytomètre permet la détection sensible des VEs

La cytométrie en flux est une technique de référence pour la caractérisation des cellules, mais son manque de sensibilité aux particules de petites tailles entrave son utilisation pour l'analyse des VEs. De nombreuses stratégies ont été établies pour améliorer la résolution des cytomètres. Nous avons voulu mettre au point un protocole qui combine plusieurs de ces stratégies pour l'analyse des VEs en circulation. L'une d'entre elles est l'utilisation du V-SSC pour la détection des VEs. La quantité de lumière diffusée par une particule est proportionnelle à son diamètre, mais inversement proportionnelle à la longueur d'onde utilisée pour la détecter. Ainsi, la longueur d'onde du violet (405 nm) permet une plus grande diffusion latérale de la lumière par la particule, quelle que soit sa taille, que la longueur d'onde bleue (488 nm) (98)(**Figure 8A**). Grâce à ces configurations, on est capable de distinguer les huit populations de billes contenues dans l'Apogee Mix, même celles de tailles assez proches (240 nm vs 300nm). Les plus petites billes (110 nm) sortent parfaitement du bruit de fond de l'appareil. L'Apogee Mix va également servir à ajuster les voltages PMT du V-SSC et FITC et à placer la région d'intérêt VEs. Cette région d'intérêt est tracée de façon à contenir tous les événements CFSE⁺ (FITC) qui ont une taille comprise entre 100 et 1000 nm en se référant à la distribution des billes de silice non fluorescente. Puisque l'indice de réfraction des billes de silice ($n=1,43$) est semblable à celui des VEs ($n=1,42$), elles permettent une meilleure estimation de la taille des VEs que les billes de latex ($n=1,59$). En effet, deux particules de même taille ayant des indices de réfraction très différents ne diffusent pas la même quantité de lumière. Dans l'objectif de répondre à notre hypothèse, il était nécessaire d'obtenir une quantification absolue des VEs en circulation. Pour ce faire, on a eu recours à des CB fluorescentes en PE de concentration connue (**Figure 8B**), qui vont permettre de convertir les nombres d'évènements en valeur absolue comme indiqué dans la section 3.4. des méthodes. Plusieurs contrôles ont été passés pour valider le protocole et les configurations de l'appareil. La **Figure 8C** représente une superposition (*overlay*) de deux histogrammes : PFP marqué au CFSE et PFP contrôle non marqué au CFSE. Ceci confirme que nos paramètres sont capables de discriminer la population CFSE⁺ de celle qui est CFSE⁻. Le principe du marquage au

CFSE confirme que les événements CFSE⁺ sont nécessairement des vésicules intactes. En effet, il s'agit d'une molécule non fluorescente qui diffuse passivement dans les VEs. Une fois à l'intérieur, son groupement acétate est clivé par les estérases contenues dans les VEs. Cette molécule devient alors fluorescente et forme des liaisons covalentes avec les protéines. Grâce à cette liaison, le CFSE est retenue au niveau des VEs (78, 132).

Notre protocole ne comporte pas une étape de lavage après incubation du PFP avec les anticorps et ceci dans le but d'éviter la centrifugation et la perte de VEs contenues dans nos échantillons. En générale, l'élimination des anticorps libres en excès se fait par lavage avec une solution tampon par centrifugation. Dans le cas des VEs, on devrait avoir plutôt recours à une ultracentrifugation, étape très longue qui risque d'affecter la stabilité du marquage fluorescent. En absence de lavage, les anticorps libres dans l'échantillon génèrent un bruit de fond assez important. Pour faire face à cette contrainte, l'élimination des anticorps agrégés par filtration permet de réduire ce bruit (133). Malgré les précautions employées, il est primordial de contrôler ce facteur en mesurant le bruit de fond, en incubant les différents mix d'anticorps avec le CFSE dans l'AV buffer pendant 30 minutes à 37°C. Quelques événements sont détectés dans ces échantillons et ils correspondent donc aux anticorps libres, non liés à des VEs (**Figure 8D**). Pour prévenir une surestimation, ce nombre d'événements sera soustrait du nombre absolu lors de la quantification des VEs.

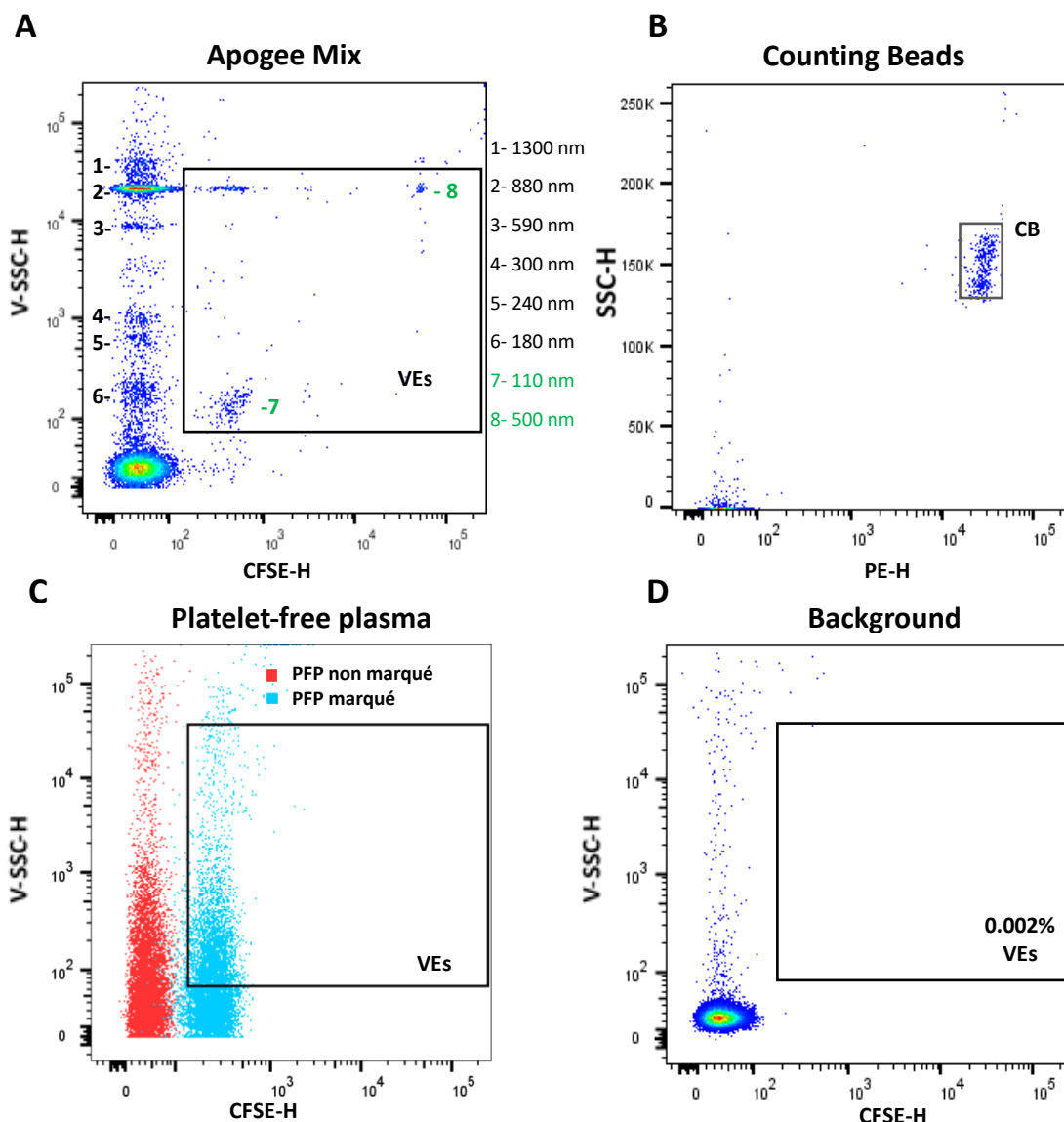


Figure 8. Détection des VEs par V-SSC.

(A) Diagramme de nuage de points « dot plot » représentant l'Apogee Mix, mélange de billes calibrées. Il contient des billes de silice non fluorescentes (#1 à #6), qui permettent de tracer la région d'intérêt VEs et des billes de latex fluorescentes en FITC (#7 et #8) qui servent à ajuster le voltage de ce canal. (B) Pour la quantification absolue des VEs en circulation, des billes fluorescentes en PE sont utilisées. Le calcul de la concentration des VEs prend en compte le nombre d'évènements dans la région d'intérêt CB et la concentration de ces billes. (C) Superposition des histogrammes de fluorescence du PFP marqué (bleu) et non marqué (rouge) au CFSE pour valider le marquage au CFSE et les configurations utilisées. (D) Les anticorps et le CFSE ont été incubés pendant 30 minutes à 37°C sans PFP. Ce contrôle sert à évaluer l'intensité du bruit de fond ou background causé par les anticorps non liés au VEs dans l'échantillon. Quelques évènements sont détectés dans la région d'intérêt des VEs et seront soustraits au moment de l'analyse des échantillons de PFP.

4.2. Stratégie d'identification des sous-populations de VEs

Bien qu'il soit dépourvu de cellules, le PFP reste un fluide complexe. Afin de s'assurer de la nature des événements détectés, nous avons mis en place des stratégies d'identification très rigoureuses et reproductibles résumées à la **Figure 9**. Quel que soit le sous-type de VEs à isoler, la première étape consiste à sélectionner les événements CFSE⁺ qui tombent dans la région d'intérêt VEs (**Figure 10A**). Le marquage au CFSE devrait a priori être spécifique aux cellules et aux VEs, mais les études affirment que ce fluorochrome est tout de même capable de marquer les lipoprotéines et de générer un bruit de fond important (134) (135). Pour remédier à ce manque de spécificité et pour répondre aux exigences de l'ISEV (78), nous avons ajouté un marqueur supplémentaire, le complexe majeur d'histocompatibilité I (CMH-I). Ainsi à partir des événements de la région d'intérêt VEs, uniquement ceux qui sont CMH-I⁺ sont retenus et vont constituer notre population de VEs totales (CFSE⁺CMH-I⁺) (**Figure 10B**). Ceci garantit que les événements sélectionnés correspondent à des vésicules d'origine humaine de taille comprise entre 100 et 1000 nm. À partir de cette étape, les sous-populations de VEs sont isolées en fonction de l'absence ou de la présence de marqueurs à leurs surfaces. Les VEs GR et VEs PLT sont sélectionnées à partir des « *dot plot* » bi-paramétriques : V-SSC vs. CD235a (**Figure 10C**) et V-SSC vs. CD41a (**Figure 10D**). Elles sont définies comme étant CFSE⁺CMH-I⁺CD235a⁺ pour les VEs GR et CFSE⁺CMH-I⁺CD41a⁺ pour les VEs PLT. Le niveau d'expression de CLEC-2 par les VEs PLT est également évalué. C'est un paramètre intéressant à prendre en considération vu son rôle au niveau de la jonction lympho-veineuse. Les VEs dérivées de lymphocytes sont isolées à partir de la population CFSE⁺CMH-I⁺ en fonction de l'expression du marqueur leucocytaire CD45 et des marqueurs CD3 et CD19. Ainsi les VEs dérivées de lymphocyte T (VEs LyT) sont CFSE⁺CMH-I⁺CD45⁺CD19⁺ (**Figure 10E**) et les VEs dérivées de lymphocyte B (VEs LyB) sont CFSE⁺CMH-I⁺CD45⁺CD3⁺ (**Figure 10F**). Dans le cadre de ce mémoire, nous voulions tester l'association CD14/CD16 afin de distinguer les différents types de monocytes à savoir les classiques CD14⁺CD16⁻, les intermédiaires CD14⁺CD16⁺ et les non-classiques CD14⁻CD16⁺. Elles se distinguent non seulement par leurs marqueurs cellulaires mais également par leurs effets physiologiques différents qui seront discutés plus tard. En se basant sur ces différences phénotypiques, les VEs qui dérivent des sous-classes de monocytes ont été sélectionnées à partir des événements CFSE⁺CMH-I⁺CD45⁺ (**Figure 11A**) qui expriment ou non le

CD14 et/ou CD16 (**Figure 11B**). Elles seront désignées par VEs CD14⁺CD16⁻, VEs CD14⁺CD16⁺ et VEs CD14⁻CD16⁺. De plus, dans les limites de ce projet, il nous semble intéressant d'analyser les VEs qui dérivent de cellules progénitrices myéloïdes puisqu'elles participent à la lymphangiogenèse (136). Ces cellules se caractérisent par l'expression de marqueurs myéloïdes (CD14, CD11b etc.) et lymphatiques (LYVE-1, VEGFR-3 etc.) d'où l'isolation des VEs CFSE⁺CMHI⁺CD45⁺CD14⁺LYVE-1⁺ qu'on va nommer VEs CD14⁺LYVE-1⁺ (**Figure 11C**). Pour l'analyse des VEs dérivées de CEV (VEs CEV) et de CEL (VEs CEL), notre stratégie consiste à sélectionner celles produites par les CE de façon générale puis de les séparer en fonction de l'expression de la PDPN. Nous avons donc commencé par choisir les VEs CE soit VEs CD31⁺CD41⁻ (**Figure 11D**). Il est primordial d'associer ces deux marqueurs puisque le CD31 est également exprimé par les plaquettes tel que le montre la figure 9D : la population CD31⁺CD41⁺ sur le « *dot plot* » correspond aux plaquettes. La dernière étape vise à isoler les deux sous-populations de CE : les VEs CEV (CFSE⁺CMHI⁺CD31⁺CD41⁻PDPN⁻) et les VEs CEL (CFSE⁺CMHI⁺CD31⁺CD41⁻PDPN⁺) (**Figure 11E**). Afin de vérifier le bon emplacement des régions d'intérêts dans la figure 9E, nous avons évalué le niveau d'expression du VEGFR-3 par ces deux sous-populations de VEs. Conformément à la littérature, les VEs CEV expriment très peu le VEGFR-3 alors que les VEs CEL l'expriment fortement (**Figure 11F**).

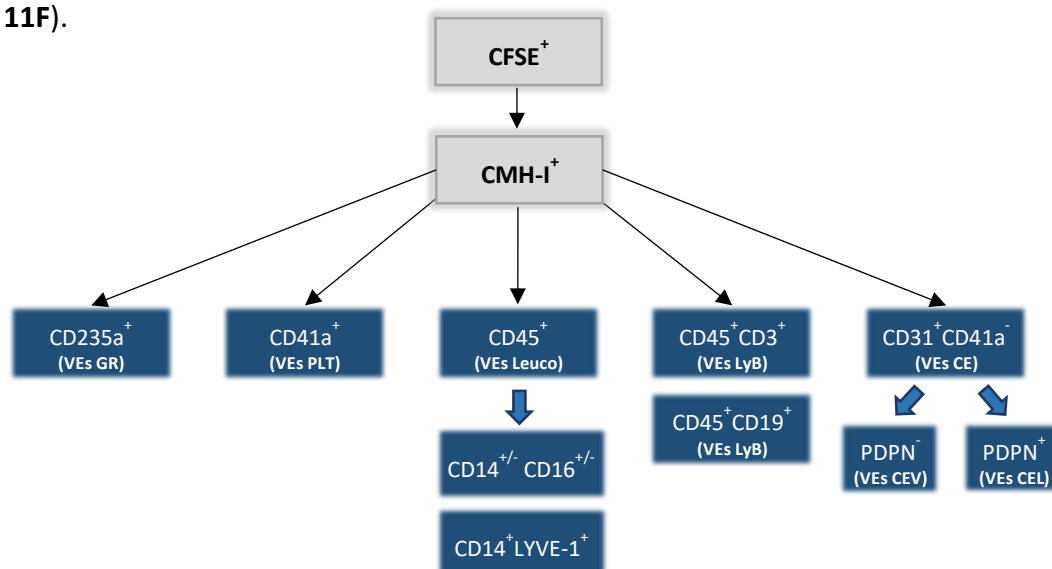


Figure 9. Illustration schématique de la stratégie d'identification des VEs.

La première étape de la stratégie d'identification des VEs consiste à sélectionner les événements CFSE⁺ qui tombent dans la région d'intérêt VEs et qui expriment CMH-I. À partir de cette étape, l'identification des sous-populations de VEs se fait en fonction de l'expression de marqueurs de surface spécifiques.

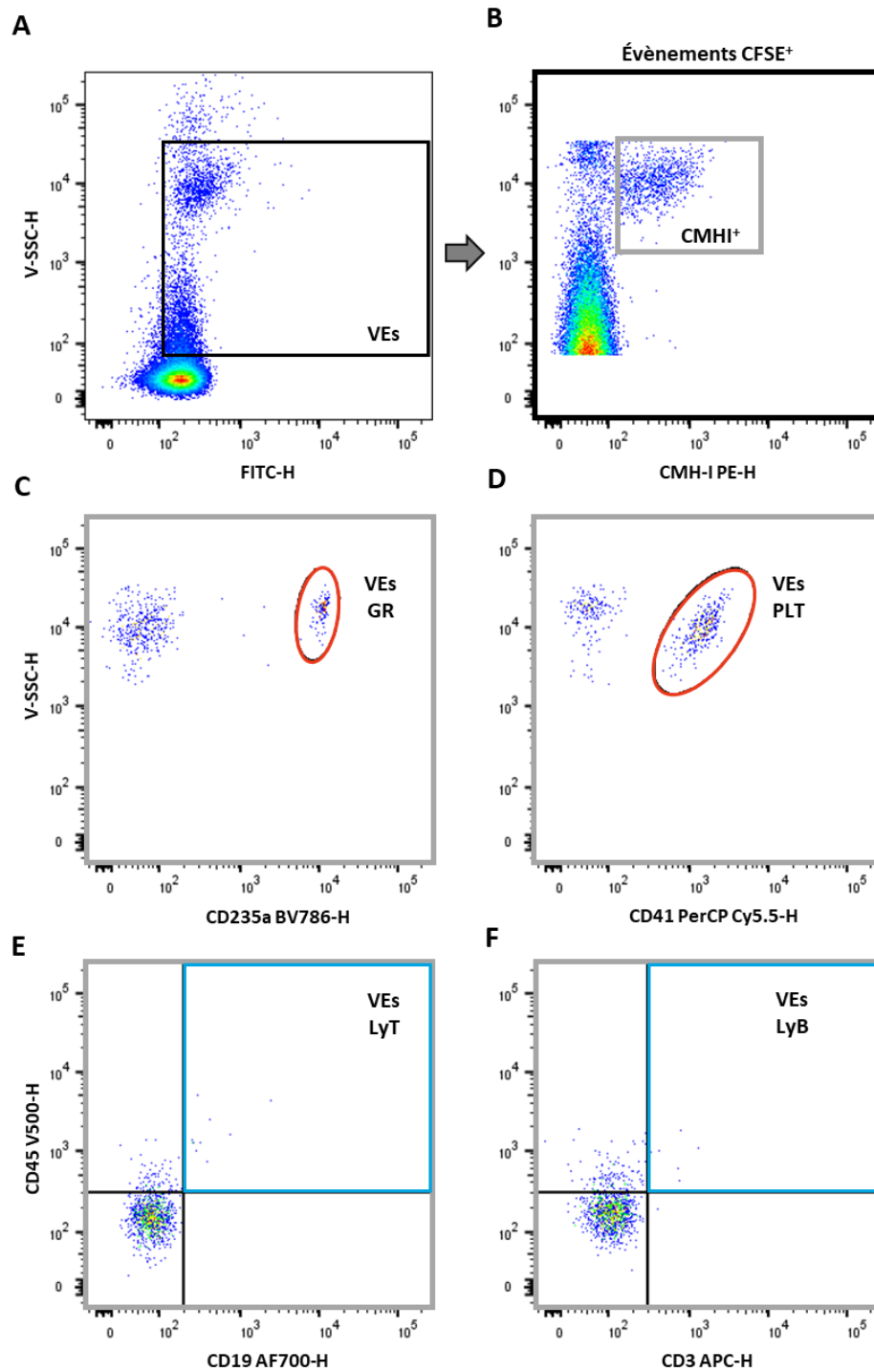


Figure 10. Stratégie d'identification des VEs dérivées de globules rouges, plaquettes et lymphocytes.

(A-B) À partir des évènements CFSE⁺ qui sortent dans la région d'intérêt VEs, seuls ceux qui expriment CMH-I⁺ sont sélectionnés. Les sous-populations de (C) VEs GR, (D) VEs PLT, (E) VEs LyT et (F) VEs LyB sont ensuite isolées en fonction de l'expression de leurs marqueurs spécifiques à partir des évènements CFSE⁺CMH-I⁺.

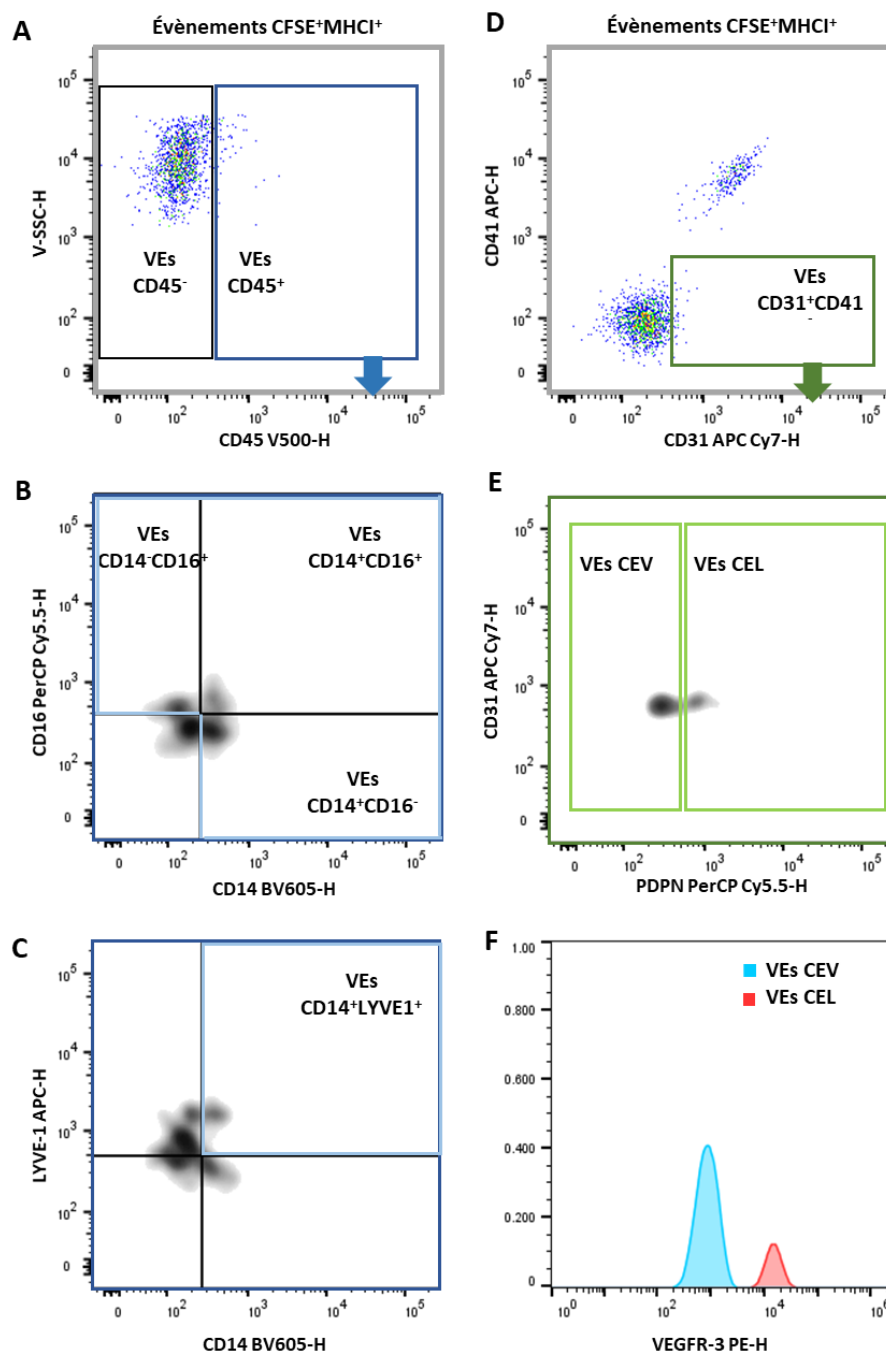


Figure 11. Stratégie d'identification des VEs dérivées de monocytes, cellules progénitrices myéloïdes et cellules endothéliales.

(A) Les VEs CD45⁺ sont sélectionnées à partir des évènements CFSE⁺MHC-I⁺. Cette sous-population permettra d'isoler (B) les VEs dérivées de monocytes en fonction de l'expression du CD14 et CD16 et (C) les VEs CD14⁺LYVE-1⁺. (D-E) La population VEs CE se définit comme étant CFSE⁺MHC-I⁺CD31⁺CD41⁻ et permet de distinguer par la suite les VEs CEV (PDPN⁻) et VEs CEL (PDPN⁺). (F) Le haut niveau d'expression du VEGFR-3 par les VEs CEL, contrairement à celui des VEs CEV, appuie la bonne désignation des régions d'intérêts PDPN⁻ et PDPN⁺.

4.3. Caractérisation des évènements détectés

Compte tenu des divers facteurs pouvant affecter l'identification des VEs, il est primordial de vérifier que les évènements détectés par notre appareil sont effectivement d'origine cellulaire, non pas juste des débris ou du bruit de fond. Pour ce faire, nous avons traité nos échantillons de PFP marqués avec du Triton X-100, détergent qui solubilise les bicouches lipidiques et ainsi les VEs. En comparant les nuages de points associés au PFP marqué avant (**Figure 12 A-B**) et après traitement (**Figure 12 C-D**), il est évident que tous les évènements présents dans la région d'intérêt VEs PLT et VEs GR ont été solubilisés par le Triton X-100. La quantification des évènements à l'aide de billes de comptage confirme ces observations. En effet, l'ajout du Triton X-100 provoque une diminution significative voire même une disparition totale des évènements dans la région d'intérêt VEs PLT (**Figure 12E**) et VEs GR (**Figure 12F**). À la lumière de ces résultats, nous pouvons donc affirmer que notre protocole permet la détection adéquate nécessaire à l'analyse des VEs. Ce test a été effectué sur toutes les sous-populations de VEs déjà mentionnées. En plus de leur bicouche lipidique, les VEs se caractérisent par leur taille. Nous avons donc choisi de mesurer les VEs par NTA. Cette technique est très efficace pour analyser la distribution de la taille des petites particules dans des échantillons purifiés contenant uniquement les populations d'intérêts. À partir du PFP marqué provenant des sujets des deux groupes, nous avons trié les évènements qui sortent dans la région d'intérêt VEs (**Figure 10A**) grâce au trieur cellulaire (FACSAria Fusion). Les échantillons de VEs ainsi purifiés sont ensuite analysés par NTA. Les particules détectées sont de tailles comprises entre 100 et 1000 nm ce qui valide la précision de notre région d'intérêt VEs et de notre appareil (**Figure 13**). Les fréquences d'évènements les plus élevées sont aux alentours de 100 à 300nm ce qui est conforme à la littérature (137). La distribution de taille des VEs est semblable pour les deux groupes mais les VEs du groupe ATCD ont tendance à être plus petites (non significative). Pour conclure, toutes ces observations confirment que les évènements détectés par notre protocole sont effectivement des VEs circulantes (50-1000nm).

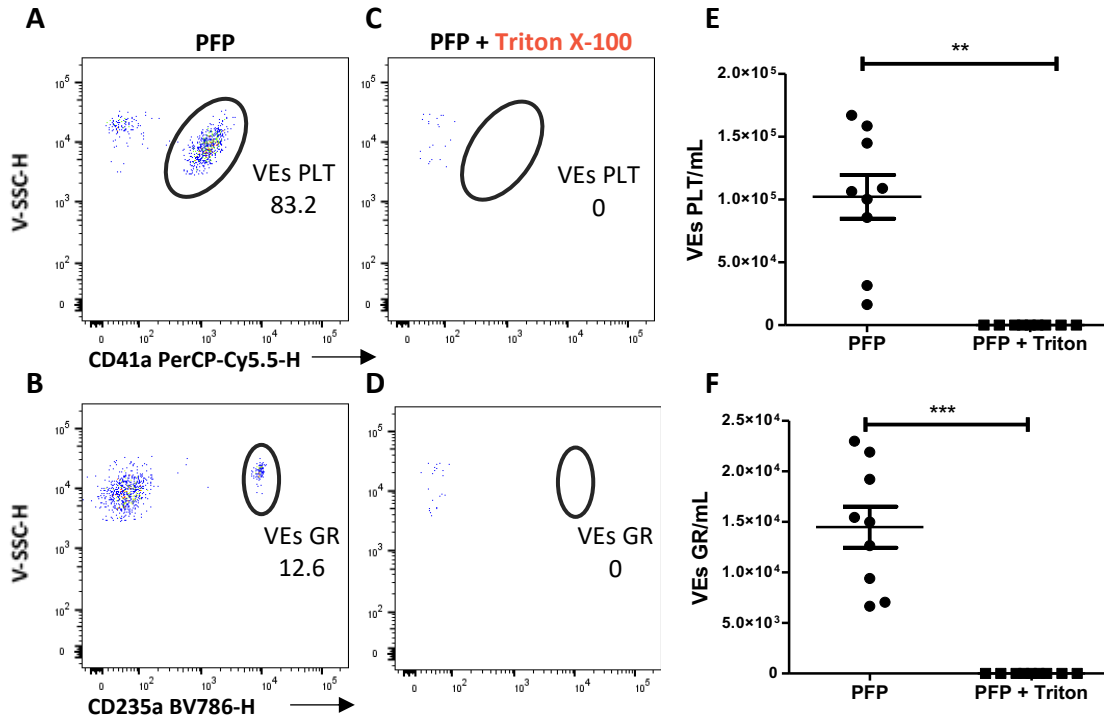


Figure 12. Évaluation de la sensibilité des événements détectés au Triton X-100.

(A-B) Le PFP est marqué avec du CFSE et un mélange d'anticorps dirigé contre les VEs PLT et GR. (C-D) L'ajout de 0.05 % de Triton X-100 à ces échantillons solubilise tous les événements détectés au préalable. (E-F) La quantification absolue montre une diminution significative des événements à la suite du traitement ce qui confirme leur origine vésiculaire. Les données sont représentatives de 9 échantillons de PFP. Test t de Student apparié ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

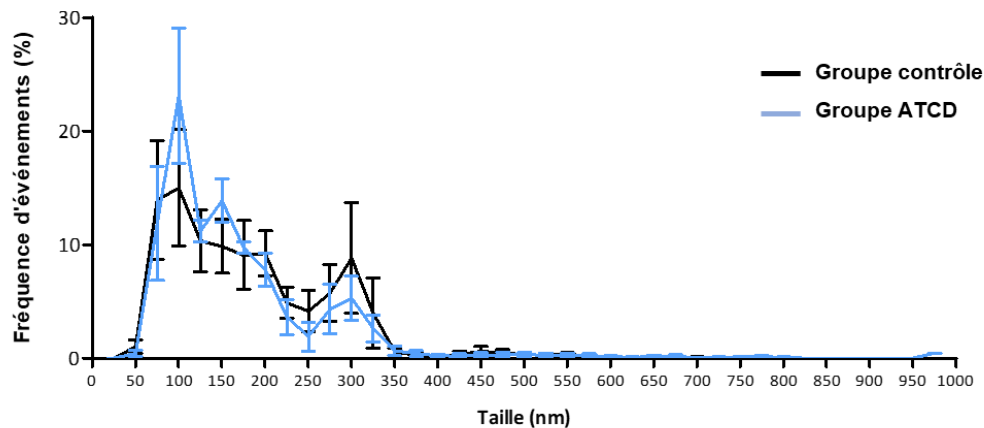


Figure 13. Mesure de la taille des VEs triées par NTA.

Distribution de la taille des VEs triées, selon la région d'intérêt VEs prédéfinie, à partir des échantillons de PFP des sujets des deux groupes : Contrôle (n= 6, noir) et ATCD (n=4, bleu). Les courbes correspondent à la moyenne des fréquences relatives \pm SEM (%) pour chaque taille. Test t de Student ; différence non significative pour tous les points.

4.4. Les caractéristiques des sujets recrutés

Les principales caractéristiques des sujets recrutés dans chacun des deux groupes sont décrites dans le **tableau 4**. Au 31 Octobre 2019, 12 sujets ont été inclus dans le groupe contrôle et 9 dans le groupe ATCD, pour un total de 21 participants dont 48 % sont des femmes (50 % du groupe contrôle et 55 % du groupe ATCD). L'âge moyen est de 54,4 ans pour le groupe contrôle contre 50,1 ans pour le groupe ATCD ($p < 0,05$). Il est important de noter qu'avec l'âge la fonction lymphatique et la concentration de VEs en circulation diminuent (138, 139) d'où le besoin de tenir compte de ce facteur. Il n'y a pas de différence significative entre le groupe contrôle et groupe ATCD pour les paramètres suivants : indice de masse corporel (IMC) ($27,5 \pm 6,7$ vs $29,7 \pm 6,8$), pression artérielle systolique ($118,5 \pm 11,1$ vs $126,2 \pm 10,3$) et diastolique ($76,6 \pm 9,3$ vs $79,2 \pm 4,8$), glycémie ($5,1 \pm 0,3$ vs $5,1 \pm 0,4$) et taux de LDL-C ($2,6 \pm 0,5$ vs $2,7 \pm 0,6$), de HDL-C ($1,8 \pm 0,4$ vs $2,0 \pm 1,1$) et de triglycérides ($1,1 \pm 0,6$ vs $1,3 \pm 0,6$), respectivement. Il faut prendre en considération tous ces paramètres puisqu'ils affectent la fonction lymphatique et la concentration des VEs en circulation. En cas de dyslipidémie, de diabète, d'obésité et d'HTA la capacité de drainage des vaisseaux collecteurs est réduite (125, 140, 141) et la libération des VEs est augmentée (126, 142). Nous pouvons confirmer que les sujets recrutés ne souffrent d'aucune de ces conditions. Le taux moyen de hs-CRP est de $1,8 \pm 2,1$ mg/L pour le groupe contrôle et de $2,7 \pm 2,3$ mg/L pour le groupe ATCD ($p = 0,351$). La quantification des éléments figurés du sang est semblable pour les deux groupes et se situe dans la fourchette de normalité. Il est donc acceptable de dire que les deux cohortes sont comparables, quoique légèrement plus jeunes pour le groupe ATCD.

	Groupe contrôle (n=12)	Groupe ATCD (n=9)	Valeur p
Nombres de femme, n (%)	5 (42%)	5 (55%)	-
Age (année)	54,4 ± 2,9	50,1 ± 4,0	< 0,05
Numération formule sanguine			
Leucocytes (10 ⁹ /L)	5,1 ± 1,2	4,79 ± 0,8	0,455
Erythrocytes (10 ⁹ /L)	4,6 ± 0,43	4,72 ± 0,33	0,561
Plaquettes (10 ⁹ /L)	229,2 ± 47,8	232,7 ± 77,4	0,899
Facteur de risque CV			
IMC (kg/m ²)	27,5 ± 6,7	29,7 ± 6,8	0,475
Pression systolique (mm Hg)	118,5 ± 11,1	126,2 ± 10,3	0,121
Pression diastolique (mm Hg)	76,6 ± 9,3	79,2 ± 4,8	0,465
Glycémie (mmol/L)	5,1 ± 0,3	5,1 ± 0,4	0,641
Cholestérol total (mmol/L)	5,0 ± 0,5	4,9 ± 0,6	0,912
HDL-C (mmol/L)	1,8 ± 0,4	2,0 ± 1,1	0,614
LDL-C (mmol/L)	2,6 ± 0,5	2,7 ± 0,6	0,727
Triglycérides (mmol/L)	1,1 ± 0,6	1,3 ± 0,6	0,673
hs-CRP (mg/L)	1,8 ± 2,1	2,7 ± 2,3	0,351
INR	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,453
PTT (secondes)	28,2 ± 4,3	28,2 ± 1,0	1,000

Toutes les variables sont rapportées en moyenne ± écart-type (SD) sauf si indiqué autrement.

L'indice de masse corporelle (IMC) correspond au poids (kg) divisé par la taille (m²) ; CV : cardiovasculaire ; INR : international normalized ratio ; PTT : temps de thromboplastine

Tableau 4 : Caractéristiques des sujets recrutés dans les deux groupes

4.5. Le dosage des cytokines inflammatoires ne semble pas discriminer les sujets du groupe ATCD

Plusieurs biomarqueurs ont été proposés afin d'améliorer la stratification du risque cardiovasculaire. Parmi les plus populaires, on retrouve la hs-CRP et les cytokines inflammatoires (38, 39) qu'on a choisi de comparer entre les deux groupes. Les résultats relatifs à la hs-CRP ont été présentés dans le tableau 4. En ce qui concerne le taux des cytokines inflammatoires, les concentrations de l'IL-12p70, IL-1β, IL-10 et TNF sont toutes indétectables dans le sérum de nos sujets. Elles sont donc inférieures à la limite de détection établie par le fabricant (en pg/mL : <1,9 pour IL-12p70, < 7,2 pour IL-1β, < 3,3 pour IL-10 et < 3,7 pour TNF). Seules les concentrations de l'IL-6 et IL-8 ont pu être déterminées et aucune différence significative n'a été observée entre les groupes (**Figure 14 A-B**). Ceci indique que la hs-CRP et les cytokines inflammatoires ne sont pas en mesure de discriminer le groupe ATCD du groupe contrôle.

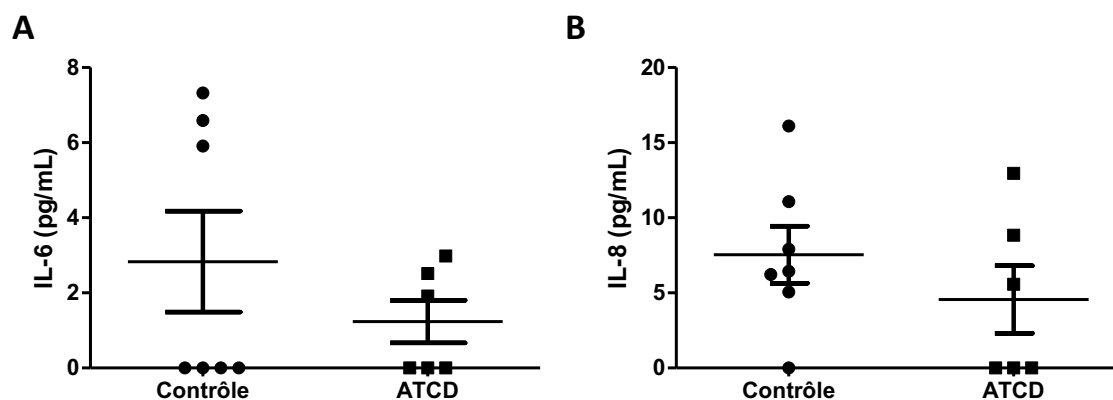


Figure 14. Dosage des cytokines inflammatoires dans le sérum des sujets.

Comparaison des concentrations (A) d'IL-6 et (B) d'IL-8 dosées par le kit CBA entre les sujets du groupe contrôle et groupe ATCD. Test non paramétrique de Mann-Whitney.

4.6. La concentration de certains sous-types de VEs semble être modulé chez les sujets du groupe ATCD

Les VEs suscitent un intérêt croissant comme médiateurs de la communication intercellulaire et biomarqueurs de plusieurs pathologies (81). Beaucoup d'efforts ont été déployés pour étudier le rôle des VEs dans l'athérosclérose. Les études prouvent que les VEs participent activement à l'initiation et à la progression de l'athérosclérose. Elles favorisent notamment la dysfonction endothéliale vasculaire. Les taux des différentes sous-populations de VEs sont de plus augmentés en présence de maladies coronariennes (143). Il semble alors intéressant d'étudier l'implication des VEs dans l'athérosclérose sous une perspective différente. En d'autres termes, les VEs pourraient affecter la fonction lymphatique, composante clé de l'athérosclérose, et constituer de biomarqueurs plus précoces de cette pathologie. Pour cela, nous avons quantifié les concentrations des VEs dans les deux groupes. La concentration de VEs totales varie entre $2,5 \times 10^4$ et $1,6 \times 10^5$ VEs/mL, tous groupes confondus. Ces chiffres concordent avec ceux qui ont déjà été rapportés dans la littérature chez des individus sains (144). De plus, 40 à 90 % de ces VEs sont PS⁺. Le groupe ATCD tend à avoir moins de VEs totales en circulation que le groupe contrôle (**Figure 15A**). Cette même tendance est observée pour les VEs PS⁺ (**Figure 15B**). La différence entre les niveaux des différents sous-types de VEs soit les VEs GR, PLT, Leuco et CE, pourraient expliquer ces différences globales observées. (**Figure 15C-F**). Les sujets du groupe contrôle semblent avoir en moyenne plus de VEs PLT que le groupe ATCD. En s'intéressant aux sous-types de VEs CD45⁺,

on remarque d'autres disparités entre les groupes (**Figure 16**). Par exemple, de très faibles tendances se dessinent par rapport aux concentrations des VEs dérivées de monocytes (**Figure 16A-C et 17B**). Il y a une diminution des taux de VEs CD14⁺CD16⁻ et CD14⁺CD16⁺ avec une augmentation des taux de VEs CD14⁻CD16⁺ chez le groupe ATCD. Ces différences ne sont pas observées au niveau des cellules d'origine monocyttaire (**Figure 17A**). Plus encore, la concentration de VEs CD14⁺LYVE-1⁺ semble plus faible chez le groupe ATCD alors que celle des VEs LyT semble au contraire plus élevée (**Figure 16D-E**). En partant de l'idée que les VEs CEV sont des biomarqueurs de la dysfonction endothéliale vasculaire, la quantité de VEs CEL en circulation devrait refléter l'état de l'endothélium lymphatique. En comparant les concentrations des sous-types de VEs CE, on remarque que leurs profils sont presque identiques chez les deux groupes (**Figure 18**). Cependant, trois sujets du groupe ATCD se démarquent du reste par des taux de CEV plus élevés (**Figure 18B**). L'accumulation de données supplémentaires est requise pour confirmer toutes ces observations. Il est toutefois important de noter que la concentration des cellules en circulation (GR, PLT et Leuco) semble jusqu'à présent identique entre les deux groupes (Tableau 4). Toute différence observée au niveau des VEs qui en dérivent est inhérente à ces VEs indépendamment des cellules d'origine.

Pour conclure, les taux de certains sous-types de VEs semblent discriminer les sujets à risque de MCV, contrairement aux cytokines inflammatoires et hs-CRP.

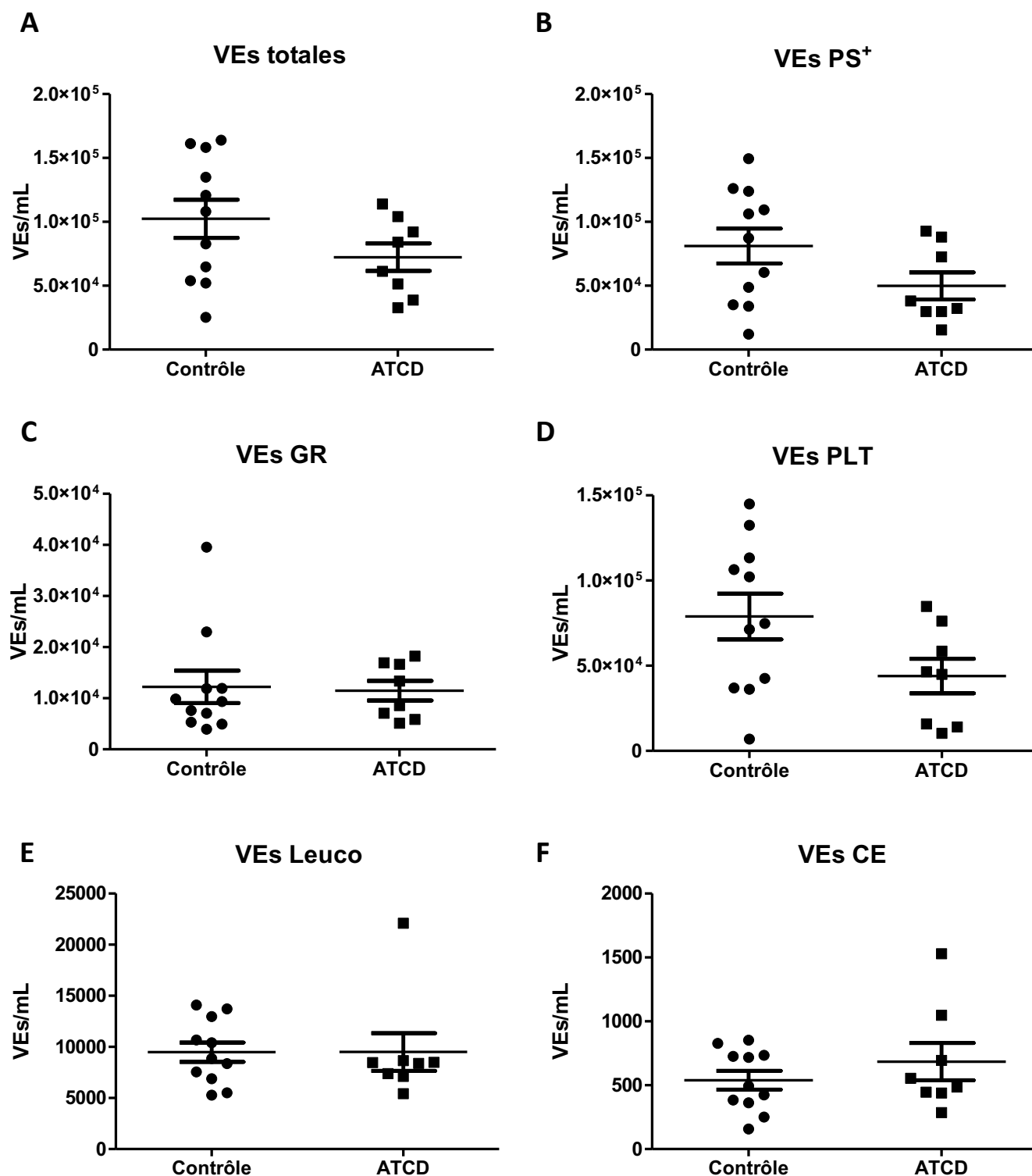


Figure 15. Quantification des grands sous-types de VEs en circulation par cytométrie en flux. Comparaison des concentrations des (A) VEs totales, (B) VEs PS⁺, (C) VEs GR, (D) VEs PLT, (E) VEs Leuco et (F) VEs CE en circulation entre le groupe CTRL et le groupe ATCD.

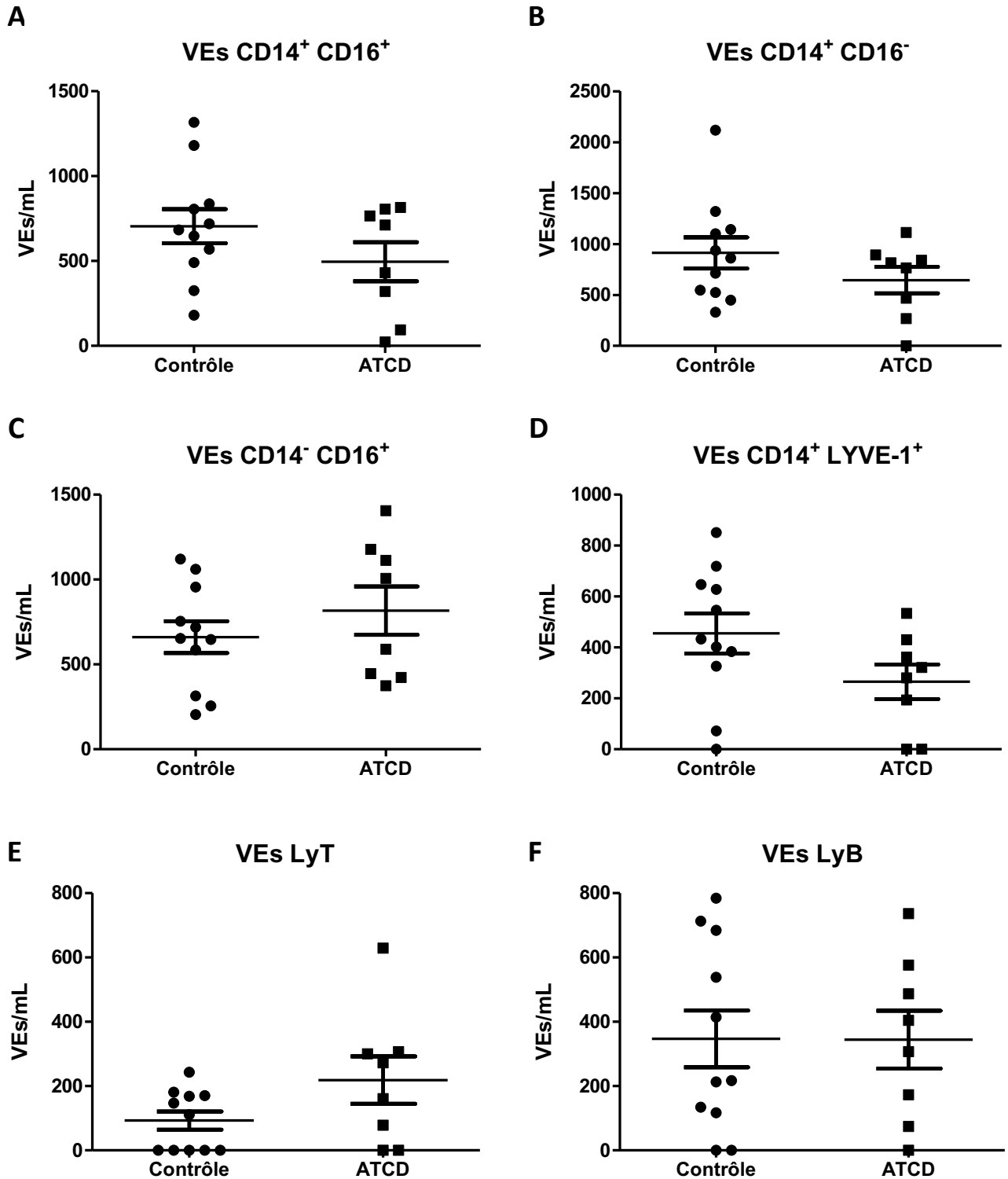


Figure 16. Quantification des sous-types de VEs CD45⁺ en circulation par cytométrie en flux. Comparaison des concentrations des **(A-C)** VEs dérivées des monocytes, **(D)** VEs CD14⁺ LYVE-1⁺ **(E)** VEs LyT et **(F)** VEs LyB en circulation entre le groupe CTRL et le groupe ATCD.

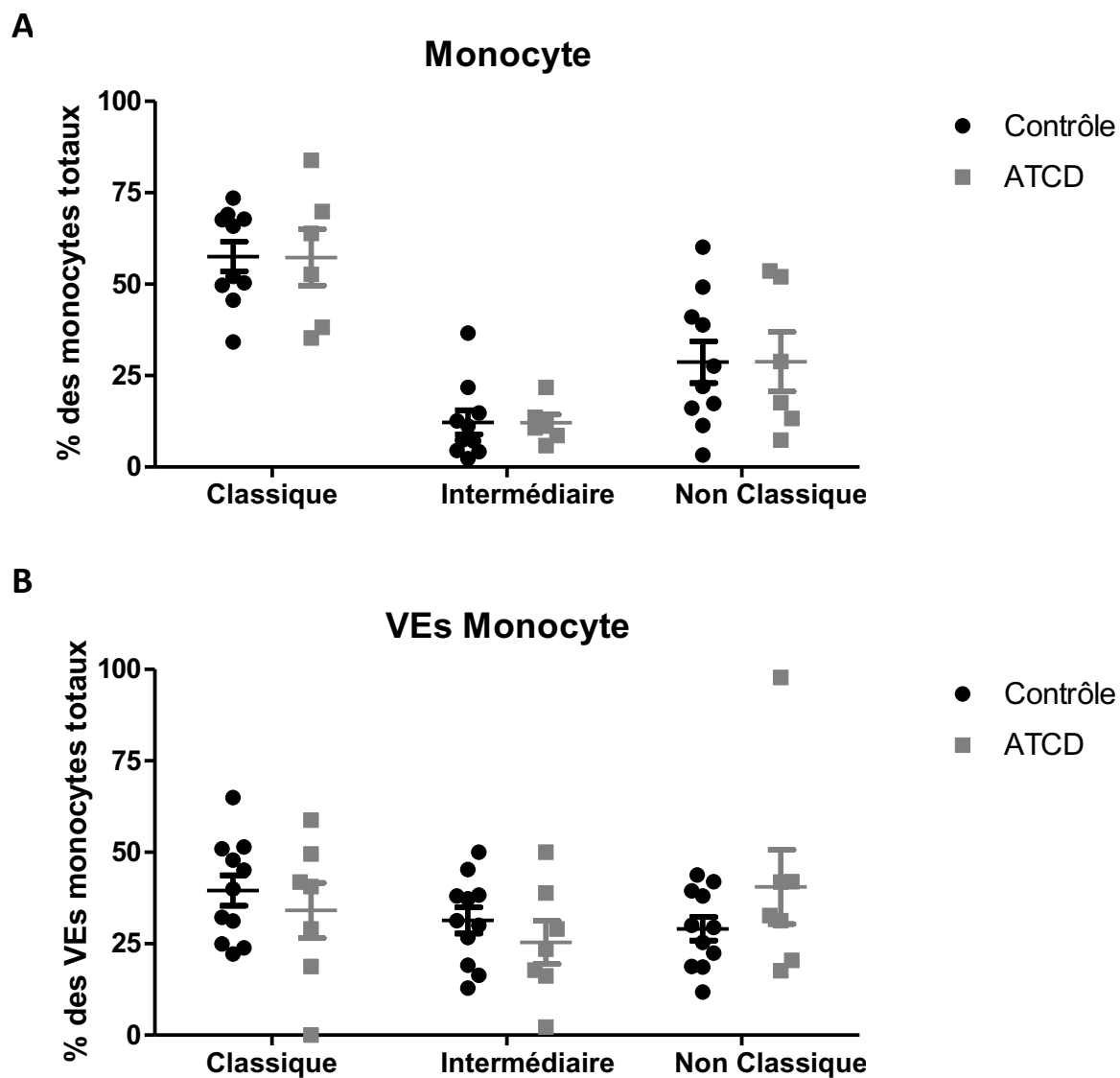


Figure 17. Pourcentage des sous-types de monocytes et VEs monocytes en circulation.

Comparaison des pourcentages (A) des VEs dérivées de monocytes et (B) des monocytes circulants entre le groupe contrôle (noir) et le groupe ATCD (gris).

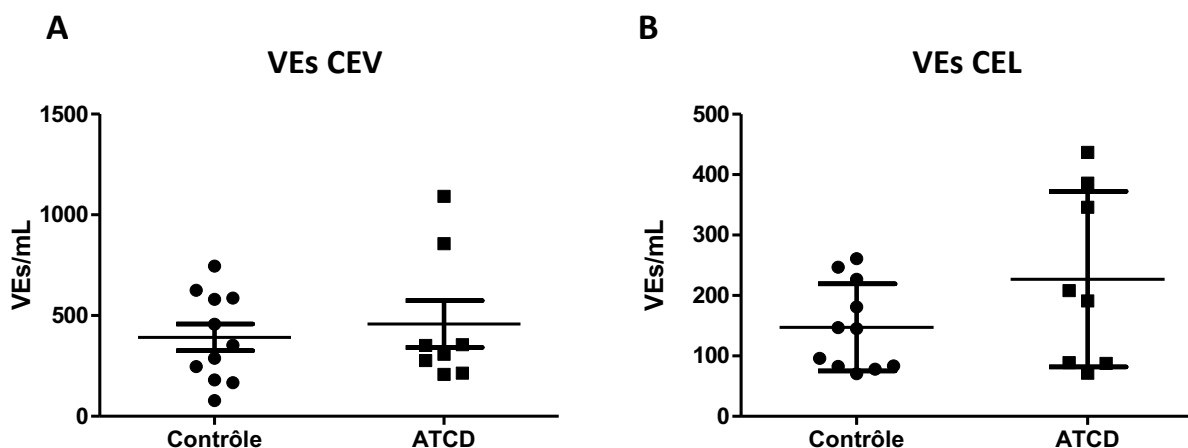


Figure 18. Quantification des sous-types de VEs CE en circulation par cytométrie en flux. Comparaison des concentrations des **(A)** VEs CEV et **(B)** VEs CEL en circulation entre le groupe CTRL et le groupe ATCD.

4.7. Les sujets du groupe ATCD semblent avoir une vitesse de propulsion de la lymphe augmentée dans les vaisseaux collecteurs

L'un des principaux objectifs de ce projet est de traduire nos découvertes fondamentales en application clinique. En d'autres termes on cherche à confirmer qu'une dysfonction lymphatique précède la formation de la lésion d'athérome chez l'homme, tout comme c'est le cas pour les souris *Ldlr^{-/-}*; *hapoB100^{+/+}*, qui sont prédisposées à développer l'athérosclérose même en l'absence d'un régime riche en cholestérol (74). De plus, nous visons à corréler éventuellement les concentrations de VEs en circulation avec la fonction lymphatique des sujets afin de mieux comprendre le rôle des VEs dans le développement de l'athérosclérose. Une analyse quantitative et qualitative de la fonction lymphatique est alors requise. Grâce à notre technique d'imagerie par proche infrarouge et l'injection d'ICG, nous avons analysé plusieurs paramètres de la fonction lymphatique chez les patients issus des groupes contrôle et ATCD. Nos résultats montrent que la fréquence et l'amplitude de contraction semblent être identiques dans les deux groupes (**Figure 19A-B**). Les vaisseaux collecteurs lymphatiques se contractent à la même fréquence et avec la même force. En revanche, la vitesse de la lymphe semble être près de deux fois plus élevée dans le groupe ATCD que le groupe CTRL (232 ± 43 mm/min vs 122 ± 15 mm/min, $p < 0,05$) (**Figure 19C**).

L'analyse des paramètres de la fonction lymphatique, et plus particulièrement la mesure de la vélocité de la lymphe, a permis de révéler des différences entre les deux groupes alors que le dosage des cytokines inflammatoires et de la hs-CRP a échoué à le faire.

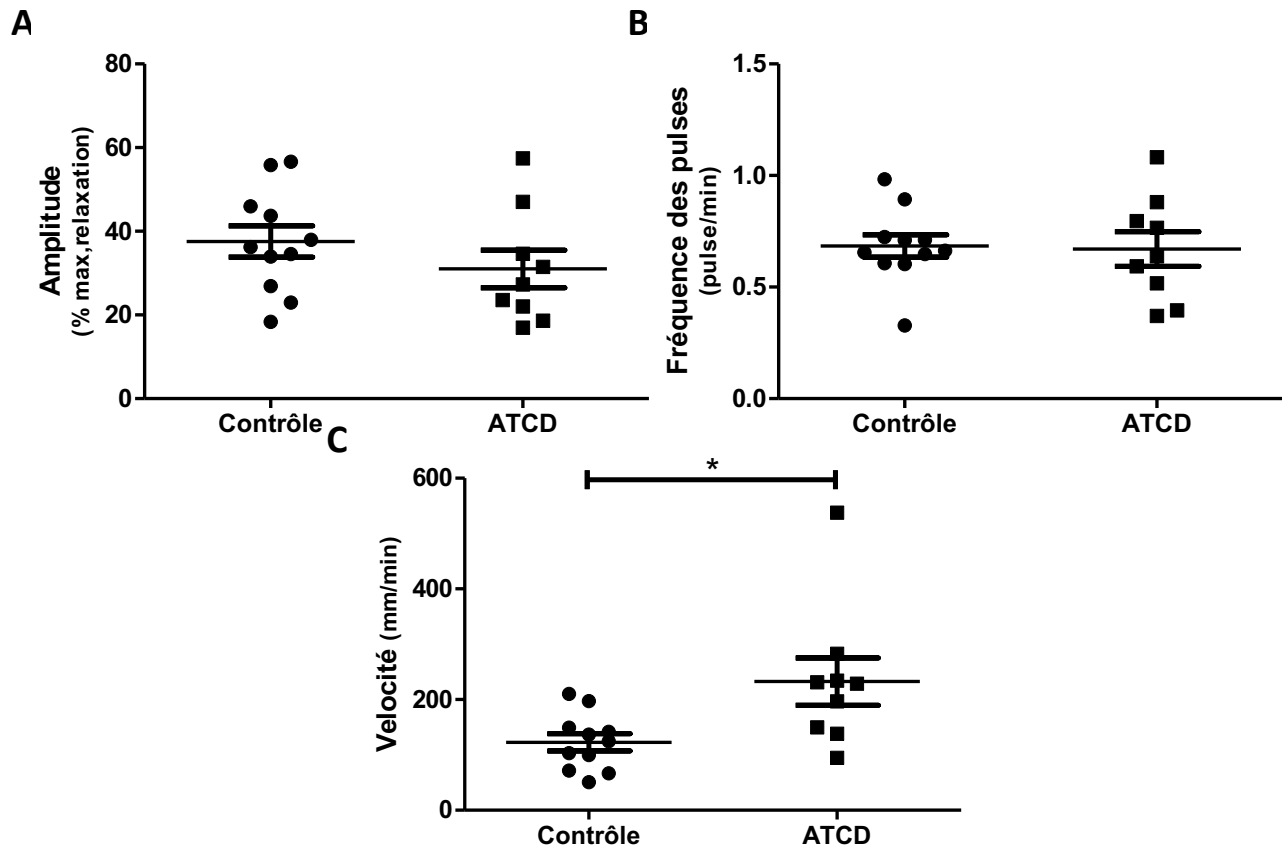


Figure 19. Analyse de la fonction lymphatique après imagerie par proche infrarouge.

À partir des images obtenues en proche infrarouge, plusieurs paramètres de la fonction lymphatique soit (A) l'amplitude et (B) la fréquence de contractions ainsi que (C) la vélocité ont été mesurés puis comparés entre les groupes grâce à image J et une interface graphique.

Chapitre 5 : Discussion

Les MCV constituent la première cause de mortalité dans le monde (2). Malgré les efforts significatifs menés pour la prévention des MCV, la moitié de ces événements surviennent chez des sujets en apparence sains et ne présentant pas les facteurs de risque traditionnels (35). Ces observations soulignent l'importance d'un dépistage précoce de l'athérosclérose et le besoin de nouveaux biomarqueurs. Les VEs et la fonction lymphatique constituent des pistes intéressantes dans ce contexte. Les VEs sont des vésicules de petites tailles libérées par toutes les cellules de l'organisme. Elles sont présentes dans plusieurs fluides biologiques dont le sang et la lymphe et interagissent avec les cellules environnantes (80, 81). La richesse de leur contenu biologique fait de ces VEs des joueurs potentiellement importants dans plusieurs pathologies (79). De nombreuses études se sont intéressées aux rôles des VEs dans l'athérosclérose. Elles se sont focalisées sur l'interaction des VEs avec les différents acteurs de cette pathologie (endothélium vasculaire, les cellules musculaires lisses, les monocytes etc.)(143) sans pour autant s'intéresser au système lymphatique qui est un acteur clé de l'athérosclérose(47). Il constitue une voie préférentielle pour la mobilisation des accepteurs de cholestérol à partir de la paroi artérielle (47). Autrement dit, le système lymphatique participe à l'évacuation du cholestérol accumulé dans la plaque et à son transport jusqu'à la circulation sanguine pour être éliminé par le foie. Nous avons démontré dans un modèle murin qu'une dysfonction lymphatique précède la formation de la plaque d'athérome et que cette dysfonction touche a priori la capacité de contraction des vaisseaux collecteurs (74).

La présence des VEs dans la lymphe et à des taux plus élevés en cas d'athérosclérose laissent place à plusieurs réflexions concernant la provenance de ces VEs et à leur rôle (80). Puisque le système lymphatique est responsable de la résorption des liquides interstitiels, il est fort probable que les VEs contenues dans ces liquides puissent être prises en charge par les capillaires lymphatiques. Il s'agit alors de VEs présentes dans le sang qui, une fois dans l'espace interstitiel, seront captées par le système lymphatique. Plus encore, le système lymphatique est le siège d'un important trafic cellulaire à l'origine de la réponse immunitaire. Ces réactions s'accompagnent de la libération de VEs dans la lymphe. Toute agression de l'endothélium lymphatique provoque

également la sécrétion de VEs dérivées des CEL. On devrait s'attendre à une augmentation de ces VEs en cas de dysfonction lymphatique. Enfin, le système lymphatique est reconnu pour son rôle dans le RCT (47). Puisque les VEs se retrouvent accumulées dans la lésion, il paraît donc probable que ces vésicules puissent être retirées de la plaque et acheminer par le système lymphatique vers le sang, tout comme le cholestérol. Ceci est confirmé par les taux élevés de VEs dans la lymphe en cas d'athérosclérose. En prenant comme modèle le rôle des VEs dans la dysfonction endothéliale vasculaire, il est possible que les VEs présentes dans la lymphe puissent interagir avec les CEL et affecter leur fonction. Pour étudier l'effet des VEs sur la fonction lymphatique, nous avons incubé des VEs PLT et VEs GR sur un endothélium lymphatique humain. Les VEs GR augmentent la production de ROS ce qui est néfaste pour les CEL. Quant aux VEs PLT, elles semblent avoir un effet protecteur sur l'endothélium lymphatique puisqu'elles réduisent le stress oxydatif tout en protégeant les CEL contre l'apoptose (124). À la lumière de ces résultats, nous pensons que les VEs sont impliquées dans la dysfonction lymphatique associée à l'athérosclérose et qui, selon nos études, précède le développement de la lésion (74).

Le projet translationnel présenté dans ce mémoire vise à confirmer cette hypothèse. Nous avons recruté deux groupes de sujets sains qui se distinguent par la présence ou non d'antécédents familiaux de MCV prématurées chez un parent du premier degré. Ce facteur de risque augmente les risques de survenue de MCV de 60 à 75 % chez des individus, même en apparence sains (9). Nos sujets ont été recrutés sur la base de critères strictes afin d'éliminer, dans la mesure du possible, tous biais de sélection. Il était important d'exclure les sujets de plus de 60 ans, les fumeurs et ceux qui souffrent de diabète, de dyslipidémie, d'HTA, et de lymphœdème. Ces conditions sont connues pour moduler les paramètres qu'on cherche à évaluer dans cette étude, à savoir la fonction lymphatique et la concentration des VEs en circulation (125, 126, 138, 142). Pour parvenir à comparer ces deux paramètres entre les groupes, nous avons dû mettre au point une méthode d'imagerie de la fonction lymphatique par proche infrarouge et optimiser un protocole pour la détection des VEs dans le PFP par cytométrie en flux. Bien qu'il soit trop tôt pour en tirer des conclusions, nos résultats préliminaires sont une excellente prémisse aux résultats à venir. En effet, la simple détection des VEs aussi petite que 100nm par un cytomètre en flux conventionnel constitue, à elle seule, une étape importante de ce projet. Le dosage des

VEs pourrait éventuellement être adopté dans la pratique clinique comme biomarqueur de plusieurs pathologies dont la dysfonction lymphatique associée à l'athérosclérose. C'est en partant de cette idée que nous avons choisi de quantifier les VEs directement dans le PFP à l'aide d'un cytomètre conventionnel qui fut facilement modifiable pour permettre la détection de VEs. Les guides de référence dans le domaine recommandent de purifier les VEs avant de les caractériser or les étapes de purification peuvent s'avérer longues, coûteuses ou à faible rendement ce qui n'est pas transposable au contexte clinique. Même s'il est exempt de cellules, le PFP reste un fluide complexe d'où le risque de surestimer les VEs en circulation. Grâce à des configurations optimales et des stratégies de marquage spécifiques, nous avons réussi à quantifier un large éventail de VEs en circulation avec précision. Nous avons effectué plusieurs tests pour s'assurer de l'origine vésiculaire des événements détectés (mesure de la taille des VEs et sensibilité au Triton X-100). Les concentrations de VEs totales obtenues varient entre $2,5 \times 10^4$ et $1,6 \times 10^5$ VEs/mL et la sous-population la plus abondante est celle des VEs PLT suivi des VEs GR. Ces résultats concordent avec les chiffres déjà rapportés dans certaines études chez des individus sains. Ces concentrations des VEs ont été mesurés par NTA ou cytométrie en flux à l'aide du FSC de base (97, 145, 146). D'autres études rapportent des valeurs plus élevées de VEs de l'ordre de 10^{10} - 10^{12} VEs/mL (144, 147). Ceci s'explique par l'utilisation de différentes techniques de quantification des VEs et le manque de standardisation des étapes pré-analytiques et analytiques (prélèvement sanguin, anticoagulant, température etc.)(78, 95). Les cellules sanguines dont les plaquettes peuvent facilement être activées, ce qui provoque une libération des VEs dans l'échantillon et une surestimation de leur taux en circulation (95). Dans le cadre de notre étude, la constance dans la manipulation et l'analyse des échantillons est requise pour assurer une comparaison fiable entre les sujets recrutés.

Nous avons également dosé des marqueurs de l'inflammation qui suscitent beaucoup d'intérêt dans le contexte de l'athérosclérose : la hs-CRP et les cytokines inflammatoires. La CRP est une protéine de la phase aigüe de l'inflammation dont les taux élevés sont liés à un risque accru de MCV (37, 38) alors que les cytokines ont un rôle bien établi dans l'initiation et l'exacerbation de la réponse inflammatoire associée à l'athérosclérose(37). Plusieurs études prospectives ont révélé une association entre le niveau de cytokines, notamment l'IL-6, l'IL-8 et TNF- α , et le risque

de MCV (40, 42, 148). Le dosage des cytokines inflammatoires et de la hs-CRP chez les sujets recrutés n'étaient pas en mesure de discriminer le groupe ATCD du groupe contrôle. En effet, il n'y a aucune différence notable, quant aux niveaux circulants de hs-CRP, d'IL-6 et d'IL-8 entre les deux groupes. Une grande variabilité a été observée chez le groupe contrôle lors du dosage de l'IL-6. Cette observation a été rapportée dans la littérature. La mesure des taux d'IL-6 en clinique pourrait notamment être limitée à cause de cette variabilité interindividuelle (41). Notons que ces marqueurs ne sont pas spécifiques de l'athérosclérose ce qui rend leur interprétation difficile. À l'inverse, en comparant les concentrations des VEs en circulation, plusieurs tendances et différences ont été observées entre les deux groupes. Indépendamment de l'impact clinique de ces différences, le dosage des VEs semblent plus adéquat pour prédire le risque d'athérosclérose que les marqueurs déjà proposés. Certains sous-types de VEs sont plus sensibles aux variations que leur cellule d'origine, comme c'est le cas pour les monocytes. Ces cellules voient leurs taux augmentés en cas d'athérosclérose vu leur rôle central dans cette pathologie (149). De très faibles tendances se dessinent par rapport aux concentrations des VEs dérivées de monocytes entre les deux groupes de sujet. Les concentrations de VEs CD14⁺CD16⁻ et CD14⁺CD16⁺ sont légèrement diminuées alors que celles relatives aux VEs CD14⁻CD16⁺ sont un peu plus élevées chez le groupe ATCD que le groupe contrôle. Ces différences ne sont pas observées au niveau des cellules d'origine monocytaire. Les études qui essaient de corréler les sous-types de monocytes avec l'athérosclérose sont assez divergentes. Certaines études suggèrent que l'augmentation des concentrations des monocytes non classiques CD14⁻CD16⁺ est associée à l'athérosclérose et à la dysfonction endothéliale (150) et que les monocytes CD14⁺CD16⁻ peuvent prédire la survenue d'événements cardiovasculaires (151). D'autres études confirment que seuls les monocytes classiques CD14⁺CD16⁺ ont une valeur prédictive pour les MCV (151, 152). De manière générale, les études démontrent une association entre les monocytes CD16⁺ et la présence de MCV alors que d'autres suggèrent qu'une augmentation des monocytes CD14⁺CD16⁻ est un marqueur de mauvais pronostic (153). Face à cette disparité, l'interprétation des résultats relatifs aux VEs dérivées de monocytes est compliquée. En revanche, le recrutement de sujets additionnels permettra de marquer davantage ces différences ou au contraire de les faire disparaître. Les VEs de monocytes pourraient alors constituer un outil plus sensible pour le dépistage de

l'athérosclérose. De plus, nous nous sommes intéressés aux sous-types de VEs capables de promouvoir ou d'altérer la fonction lymphatique par action directe sur cet endothélium ou via leur cellule d'origine. Les plaquettes jouent un rôle important au niveau de la jonction lympho-veineuse. D'ailleurs l'interaction de CLEC-2 exprimé par les plaquettes et la PDPN présente à la surface des CEL provoque une agrégation plaquettaire qui permet la séparation des circulations sanguine et lymphatique(56). Nous avons également démontré *in vitro* que les plaquettes semblent relier les CEL entre elles, ce qui permet de renforcer les jonctions intercellulaires et préserver l'intégrité lymphatique (154). Même si en condition normale la lymphe ne comporte pas de plaquettes, les effets protecteurs de ces cellules sur la fonction lymphatique sont médiés par leur VEs comme déjà mentionné plus haut (124). Nos résultats montrent que les sujets avec ATCD semblent avoir moins de VEs PLT en circulation ce qui sous-entend que l'endothélium lymphatique des sujets du groupe ATCD serait moins bien protégé. En ce qui concerne les globules rouges, nous avons déjà démontré que leurs VEs ont tendance à augmenter le stress oxydatif. Leur effet néfaste pourrait aussi découler de leur capacité à séquestrer le NO grâce à la quantité importante d'Hb libre transportée par ces VEs (112). Le taux de VEs GR en circulation chez les deux groupes de sujets ne parait pas différent. Les lymphocytes B et T ont des effets différentiels sur la fonction lymphatique et sont des constituants importants de la lymphe (155, 156). Les lymphocytes T sont de plus en plus reconnus pour leur capacité à inhiber la lymphangiogenèse alors que les lymphocytes B contribuent à la formation de nouveaux vaisseaux collecteurs (157) (158). Un autre sous-type de cellules participe également à la régulation de la lymphangiogenèse. Il s'agit des cellules progénitrices myéloïdes qui favorisent ce processus grâce à la libération de facteurs de croissance VEGF ou par différenciation en CEL (136). La quantification des VEs dérivées des lymphocytes et des cellules progénitrices myéloïdes pourrait ainsi refléter l'état des vaisseaux lymphatiques. D'ailleurs, les sujets avec ATCD semblent avoir plus de VEs LyT et moins de VEs CD14⁺ LYVE1⁺ en circulation. Ce déséquilibre par rapport au groupe contrôle pourrait indiquer la présence d'une lymphangiogenèse inadéquate. Si l'on résume les tendances les plus marquées à date à savoir une diminution des taux de VEs PLT et VEs CD14⁺ LYVE1⁺ et augmentation des taux de VEs LyT chez le groupe ATCD, on remarque que les sujets à risque de MCV ont moins de VEs qui ont un potentiel de protection du système lymphatique et plus de VEs

nocives. Ces sujets sont en quelques sortes plus à risque de dysfonction lymphatique ce qui peut expliquer l'augmentation des taux de VEs CEL chez certains individus du groupe ATCD. En effet, la libération accrue de VEs par les CEL impliquerait que l'endothélium lymphatique est en état de stress ou d'agression ce qui peut refléter le début ou la présence d'une dysfonction lymphatique. Le développement de l'athérosclérose est alors favorisé chez les sujets du groupe ATCD par défaut de RCT efficace. Pour conclure, les taux de certains sous-types de VEs semblent discriminer les sujets à risque de MCV. Ils laissent même sous-entendre que ces sujets pourraient présenter une dysfonction lymphatique favorisant le développement de l'athérosclérose.

Ces observations sont confirmées par l'évaluation de la fonction lymphatique par imagerie proche infrarouge après injection d'ICG. Les sujets du groupe ATCD semblent présenter un défaut de mécano-sensibilité de leurs lymphangions. D'ailleurs la progression de la lymphe est un processus hautement régulé en fonction des besoins de l'organisme. En effet, plusieurs signaux chimiques et physiques interviennent pour moduler la fréquence et la force de contraction des cellules musculaires entourant les lymphangions. Parmi les facteurs physiques les plus importants on retrouve le débit lymphatique et les forces de cisaillement exercées par la lymphe sur la paroi des vaisseaux. Les études montrent qu'en augmentant le débit/force de cisaillement, la fréquence et l'amplitude de contraction sont réduites par un mécanisme NO-dépendant (55). Ce mécanisme régulateur a pour rôle d'optimiser le flux lymphatique tout en limitant les dépenses énergétiques afin de préserver la fonction lymphatique. En revanche, le groupe ATCD présente une vitesse de la lymphe qui est deux fois plus élevée avec une fréquence et amplitude de contraction lymphatique identiques par rapport au groupe contrôle. Bien que les forces de cisaillement soient plus importantes à cause d'une vitesse de flux lymphatique augmentée, la qualité des contractions reste inchangée ce qui suppose un manque de réactivité des lymphangions aux signaux mécaniques. Ce manque de réactivité au facteur physique pourrait constituer les premiers signes d'une dysfonction lymphatique. En effet le maintien d'un rythme contractile fréquent avec une vitesse accrue et des contractions vigoureuses, expose les vaisseaux lymphatiques à une forte pression intraluminaire, qui à long terme peut favoriser la prolifération, le remodelage et la perte du phénotype contractile des cellules musculaires (159). L'ensemble de ces changements serait à l'origine d'une dysfonction lymphatique majeure pendant laquelle le

transport de la lymphe sera grandement diminué. Sachant qu'une dysfonction lymphatique est associée à l'athérosclérose, cette séquence d'événements pourrait conduire à l'instigation de l'accumulation de la plaque athérosclérotique (47). Face à toutes ces observations, plusieurs questions se posent : quelles sont les causes du défaut de mécano-sensibilité des lymphangions ? Comment les VEs sont-elles impliquées ? Comment expliquer la différence de concentration des VEs entre les deux groupes ? En ce qui concerne la mécano-régulation des lymphangions, elle fait intervenir plusieurs molécules dérivant de l'endothélium lymphatique à nommer le NO et les ROS. Le NO est le facteur de relaxation qui entraîne une réduction de la contraction des lymphangions. Sa présence est par ailleurs proportionnelle aux forces de cisaillement appliquées aux vaisseaux lymphatiques. Il est en équilibre fragile avec les ROS qui sont capables de le dégrader. Toute surproduction de ROS provoque alors une réduction de la biodisponibilité du NO altérant la mécano-régulation du flux lymphatique (160). L'évaluation de la production de NO et des ROS par les CEL après traitement avec les VEs pourrait constituer une piste intéressante pour expliquer les différences observées entre les deux groupes. Ces tests cellulaires sont déjà en cours et les premiers résultats s'avèrent très prometteurs. Les VEs de PLT diminuent la production de ROS, ce qui protège le NO contre la dégradation. La baisse des concentrations des VEs PLT aux propriétés antioxydantes pourrait expliquer ce défaut de mécano-sensibilité chez les sujets du groupe ATCD, par réduction de la biodisponibilité du NO. Ceci confirme que la balance NO/ROS est une piste à considérer pour expliquer l'implication des VEs dans la dysfonction lymphatique associée à l'athérosclérose.

La différence de concentrations des VEs en circulation entre les deux groupes soulèvent plusieurs hypothèses. Ces différences peuvent notamment être le reflet d'une variation du nombre de cellules d'origine et/ou d'un déséquilibre entre la sécrétion et la clairance des VEs chez les sujets du groupe ATCD. La première hypothèse peut être écartée puisqu'il n'y a pas de différence entre les deux groupes quant à la numération formule sanguine. Il faudrait se concentrer plutôt sur la balance sécrétion/clairance. Certaines études suggèrent qu'une cellule secrète en moyenne 100 VEs/heure et que la demi-vie d'élimination de ces VEs est d'environ 7 minutes (161). Il s'agit alors d'un processus hautement dynamique. La clairance des VEs se fait surtout par phagocytose via les macrophages qui reconnaissent la PS ou les intégrines présentes à la surface de ces vésicules.

D'ailleurs la déplétion des macrophages chez la souris provoque une augmentation des VEs en circulation (161). Les VEs peuvent également activer la voie du complément ce qui provoque leur dégradation. Cette activation dépend de la taille et de la composition en lipide des VEs mais également de la présence ou non de molécules inhibitrices du complément à la surface des VEs (CD55, CD59 et CD46). Ces molécules permettent aux VEs d'échapper à la dégradation pour accomplir leur fonction (162). Pour justifier les différences de concentrations de VEs entre les deux groupes, nous évaluons présentement la composition lipidique et l'expression par les VEs des différentes molécules impliquées dans leur clairance (PS, intégrines, CD55 et CD59) en collaboration avec la plateforme de lipidomique de l'ICM. Quant à la sécrétion des VEs, elle se fait de manière spontanée ou induite (81). Une augmentation d'un sous-type de VEs pourrait être liée à une activation accrue de sa cellule d'origine tout comme le contraire est vrai. Dans notre étude, la concentration des VEs reflèterait une activation renforcée des lymphocytes T contre une activation réduite des cellules progénitrices myéloïdes CD14⁺LYVE1⁺. Ces observations semblent être un indicateur d'une lymphangiogenèse inadéquate qui peut mener à une dysfonction lymphatique. En plus de leur potentiel en tant que biomarqueurs, les VEs sont des acteurs clés de la communication intercellulaire grâce à leur interaction avec les cellules cibles et le transfert de leur contenu (81). Ceci confirme l'importance d'étudier l'effet direct des VEs sur un endothélium lymphatique ainsi que le matériel transféré au CEL. Par exemple, les VEs LyT pourraient mimer l'effet de leur cellule d'origine et exacerber la dysfonction lymphatique. Nous travaillons actuellement à évaluer l'effet des VEs dans des conditions expérimentales proches des situations physiologiques. Pour cela, l'une des options consiste à injecter les VEs en intradermique chez les souris et à analyser leurs fonctions lymphatiques une fois les VEs sont prises en charge par le système lymphatique. La technique d'imagerie est basée sur le même principe que celle appliquée chez les humains. Une autre variante repose sur l'isolation de vaisseaux collecteurs des souris pour des études myographiques en présence de VEs. Ce type d'expérience permet de mesurer la contraction des cellules musculaires lymphatiques soumises à différentes conditions de pression ou de traitement. La mécano-sensibilité des vaisseaux est ainsi évaluée en réponse au traitement par des VEs après modification de la pression appliquée au vaisseau. En ce qui concerne les expériences *in vitro*, on cherche à favoriser les modèles expérimentaux qui

représentent aux mieux la structure d'un vaisseau collecteur en combinant les CEL et les cellules musculaires lymphatiques. Récemment, les nouvelles technologies microfluidiques ont permis l'évolution des cultures monocouches vers des modèles multi-cellulaires en 3D afin de reproduire le microenvironnement du tissu en question. C'est le cas des systèmes « *organ-on-a-chip* » qui consiste à mettre en coculture plusieurs types cellulaires dans des chambres perfusés pour reproduire une circulation *in vitro*. Une coculture de CEL et de cellules musculaires lymphatiques dans ce type de système permettra ainsi de reproduire un lymphangion sur une puce « *lymphagion-on-a-chip* » (163).

Même si ces résultats ne sont que préliminaires, ils sont prometteurs quant aux rôles des VEs et de la dysfonction lymphatique dans le développement de l'athérosclérose. Le recrutement de sujets additionnels permettra de marquer davantage les différences obtenues ou au contraire de les estomper. Les individus du groupe contrôle sont en moyenne plus âgés que le groupe ATCD. Cette différence d'âge doit être prise en considération lors des analyses statistiques puisque la concentration des VEs en circulation et la capacité de contraction des vaisseaux lymphatiques sont réduites avec l'âge (138, 139). Ces changements s'expliquent par une clairance plus importante des VEs (139) et des modifications structurelles et fonctionnelles du système lymphatique (164). En effet, une augmentation de la perméabilité des vaisseaux lymphatiques et une diminution du nombre de cellules musculaires lymphatiques les entourant provoquent une diminution de la fréquence et de l'amplitude de contraction avec l'âge (164). Les concentrations de VEs en circulation et les paramètres de la fonction lymphatique devront alors être ajustés pour l'âge. Concernant la quantification des VEs par cytométrie en flux, plusieurs tests ont été effectués pour s'assurer de la nature des événements détectés, mais il reste des critères à remplir pour répondre aux recommandations de l'ISEV (78). L'un des plus importants est de visualiser les particules isolées par microscopie électronique. C'est la technique de référence pour déterminer la morphologie des VEs qui apparaissent normalement sous forme de vésicules délimitées par une bicouche lipidique. Pour évaluer la taille des VEs, nous avons trié les événements qui sortent dans la région d'intérêt VEs (CFSE⁺) grâce au trieur cellulaire. Les résultats du NTA affirment que les particules isolées ont une taille conforme à celle rapportée pour le VEs (78). Il faudra sans doute refaire cette expérience en triant cette fois-ci les événements CFSE⁺ CMH-I⁺. Comme déjà

mentionné, l'ajout du CMH-I à notre stratégie de marquage était essentiel pour compenser le manque de spécificité du CFSE. Bien qu'il soit a priori spécifique aux cellules et aux VEs, le CFSE peut marquer aussi les lipoprotéines (134) (135). Il faut souligner que les lipoprotéines ont une taille qui varie de 50-200 nm et risquent alors d'interférer avec la taille de nos VEs (165). Pour s'assurer de la validité de notre NTA et répondre aux recommandations de l'ISEV, il faudrait notamment prouver l'absence de contaminants qui risquent d'être triés avec les VEs, à savoir les lipoprotéines(78). L'évaluation de la reproductibilité et la répétabilité est également nécessaire pour valider notre méthode. En d'autres termes, il faut s'assurer que les concentrations de VEs calculées sont identiques lors de mesures répétées du même échantillon dans des conditions identiques ou différentes. L'objectif ultime de cette étude sera d'associer la fonction lymphatique et les concentrations de VEs identifiées comme étant modulables en cas de dysfonction lymphatique au score de risque polygénique (SRP) de développer une MCV. Le SRP est une méthode de calcul génétique qui permet de prédire le risque de développer la maladie en question. Elle repose sur le séquençage du génome d'un individu et la détection de variantes connues pour être associées à un risque plus élevé de cette maladie (166). Dans le contexte de notre étude, l'association entre un SRP élevé pour les MCV et la présence d'une dysfonction lymphatique et des concentrations de VEs modulées permettra de confirmer notre hypothèse.

Pour conclure, nos résultats préliminaires suggèrent que les sujets avec antécédents familiaux de MCV présentent des signes de dysfonction lymphatique, qu'ils soient identifiés par la variabilité de certains sous-types de VEs ou par la présence d'une dysfonction visible par imagerie. Les sujets du groupe ATCD ont moins de VEs qui ont un potentiel de protection du système lymphatique et plus de VEs nocives. Si les VEs semblent être les biomarqueurs de cette dysfonction lymphatique, elles pourraient également en être la cause. Le recrutement de sujets additionnels et leur suivi sur une période de 5 ans permettront de confirmer ces résultats et de répondre aux questions qui se posent actuellement. D'un point de vue longitudinal, la survenue d'un événement cardiovasculaire chez les sujets recrutés constitue un paramètre majeur à surveiller. Le calcul du SRP reste une avenue des plus intéressantes à exploiter dans l'objectif de faire des VEs et de la fonction lymphatique de nouveaux biomarqueurs dans l'identification précoce des MCV.

Références bibliographiques

1. Loppnow H, Werdan K, Buerke M. Vascular cells contribute to atherosclerosis by cytokine- and innate-immunity-related inflammatory mechanisms. *Innate Immun.* 2008;14(2):63-87.
2. World Health Organisation. 2017, 17 May.
3. World Health Organisation. 2009 [Available from: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf].
4. Douglas G, Channon KM. The pathogenesis of atherosclerosis. *Medicine.* 2014;42(9):480-4.
5. Wang JC, Bennett M. Aging and Atherosclerosis. *Circulation Research.* 2012;111(2):245-59.
6. Ji H, Kim A, Ebinger JE, Niiranen TJ, Claggett BL, Bairey Merz CN, et al. Sex Differences in Blood Pressure Trajectories Over the Life Course. *JAMA Cardiol.* 2020;10.1001/jamacardio.2019.5306.
7. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, et al. Heart disease and stroke statistics—2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2011;123(4):e18-e209.
8. Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: A 26-year follow-up of the Framingham population. *American Heart Journal.* 1986;111(2):383-90.
9. Lloyd-Jones DM, Nam B-H, D'Agostino SRB, Levy D, Murabito JM, Wang TJ, et al. Parental Cardiovascular Disease as a Risk Factor for Cardiovascular Disease in Middle-aged Adults A Prospective Study of Parents and Offspring. *JAMA.* 2004;291(18):2204-11.
10. Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet.* 2004;364(9438):937-52.
11. Carlson LA, Bottiger LE, Ahfeldt PE. Risk factors for myocardial infarction in the Stockholm prospective study. A 14-year follow-up focussing on the role of plasma triglycerides and cholesterol. *Acta Med Scand.* 1979;206(5):351-60.
12. Miller M. Dyslipidemia and cardiovascular risk: the importance of early prevention. *QJM.* 2009;102(9):657-67.
13. Genest J, Hegele RA, Bergeron J, Brophy J, Carpentier A, Couture P, et al. Canadian Cardiovascular Society Position Statement on Familial Hypercholesterolemia. *Canadian Journal of Cardiology.* 2014;30(12):1471-81.
14. Crosby J, Peloso GM, Auer PL, Crosslin DR, Stitzel NO, Lange LA, et al. Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *N Engl J Med.* 2014;371(1):22-31.
15. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk.* 1996;3(2):213-9.
16. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, et al. Triglycerides and the Risk of Coronary Heart Disease. *Circulation.* 2007;115(4):450-8.

17. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, et al. 2014 Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults: Report From the Panel Members Appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*. 2014;311(5):507-20.
18. Vasan RS, Beiser A, Seshadri S, Larson MG, Kannel WB, D'Agostino RB, et al. Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: The Framingham Heart Study. *Jama*. 2002;287(8):1003-10.
19. Matheus AS, Tannus LR, Cobas RA, Palma CC, Negrato CA, Gomes MB. Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update. *Int J Hypertens*. 2013;2013:653789.
20. Diabetes Mellitus: A Major Risk Factor for Cardiovascular Disease. *Circulation*. 1999;100(10):1132-3.
21. Dokken BB. The Pathophysiology of Cardiovascular Disease and Diabetes: Beyond Blood Pressure and Lipids. *Diabetes Spectrum*. 2008;21(3):160.
22. Mozaffarian D, Wilson Peter WF, Kannel William B. Beyond Established and Novel Risk Factors. *Circulation*. 2008;117(23):3031-8.
23. Furie MB, Mitchell RN. Plaque attack: one hundred years of atherosclerosis in The American Journal of Pathology. *Am J Pathol*. 2012;180(6):2184-7.
24. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol*. 1977;86(3):675-84.
25. Steinberg D. Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation*. 1987;76(3):508-14.
26. Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev*. 2010;9(12):830-4.
27. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(2):168-75.
28. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352(16):1685-95.
29. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989;320(14):915-24.
30. Han J, Hajjar DP, Febbraio M, Nicholson AC. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem*. 1997;272(34):21654-9.
31. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiological Reviews*. 2006;86(2):515-81.
32. Sukhovshin RA, Toledano Furman NE, Tasciotti E, Trachtenberg BH. Local Inhibition of Macrophage and Smooth Muscle Cell Proliferation to Suppress Plaque Progression. *Methodist Debakey Cardiovasc J*. 2016;12(3):141-5.
33. Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, et al. Cellular Origins and Thrombogenic Activity of Microparticles Isolated From Human Atherosclerotic Plaques. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49(7):772.
34. Anlamlert W, Lenbury Y, Bell J. Modeling fibrous cap formation in atherosclerotic plaque development: stability and oscillatory behavior. *Advances in Difference Equations*. 2017;2017(1):195.

35. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJP, et al. Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(21):2195-207.
36. Kampoli A-M, Tousoulis D, Antoniadou C, Siasos G, Stefanadis C. Biomarkers of premature atherosclerosis. *Trends in Molecular Medicine*. 2009;15(7):323-32.
37. Tibaut M, Caprnda M, Kubatka P, Sinkovic A, Valentova V, Filipova S, et al. Markers of Atherosclerosis: Part 1 - Serological Markers. *Heart Lung Circ*. 2019;28(5):667-77.
38. Pearson Thomas A, Mensah George A, Alexander RW, Anderson Jeffrey L, Cannon Richard O, Criqui M, et al. Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2003;107(3):499-511.
39. Thakore AH, Guo CY, Larson MG, Corey D, Wang TJ, Vasan RS, et al. Association of multiple inflammatory markers with carotid intimal medial thickness and stenosis (from the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol*. 2007;99(11):1598-602.
40. Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, et al. Inflammatory markers and cardiovascular disease (The Health, Aging and Body Composition [Health ABC] Study). *Am J Cardiol*. 2003;92(5):522-8.
41. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2000;275(24):18138-44.
42. Tuomisto K, Jousilahti P, Sundvall J, Pajunen P, Salomaa V. C-reactive protein, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha as predictors of incident coronary and cardiovascular events and total mortality. A population-based, prospective study. *Thromb Haemost*. 2006;95(3):511-8.
43. Subirana I, Fitó M, Diaz O, Vila J, Francés A, Delpon E, et al. Prediction of coronary disease incidence by biomarkers of inflammation, oxidation, and metabolism. *Scientific Reports*. 2018;8(1):3191.
44. Cuchel M, Rader Daniel J. Macrophage Reverse Cholesterol Transport. *Circulation*. 2006;113(21):2548-55.
45. Kahn ML, Rader DJ. Lymphatics as a new active player in reverse cholesterol transport. *Cell Metab*. 2013;17(5):627-8.
46. Hoggan G, Hoggan FE. The Lymphatics of the Walls of the Larger Blood-Vessels and Lymphatics. *J Anat Physiol*. 1882;17(Pt 1):1-23.
47. Martel C, Li W, Fulp B, Platt AM, Gautier EL, Westerterp M, et al. Lymphatic vasculature mediates macrophage reverse cholesterol transport in mice. *J Clin Invest*. 2013;123(4):1571-9.
48. Csányi G, Singla B. Arterial Lymphatics in Atherosclerosis: Old Questions, New Insights, and Remaining Challenges. *J Clin Med*. 2019;8(4):495.
49. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 2005;438(7070):946-53.
50. Swartz MA. The physiology of the lymphatic system. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;50(1):3-20.
51. Leak LV, Burke JF. Fine structure of the lymphatic capillary and the adjoining connective tissue area. *American Journal of Anatomy*. 1966;118(3):785-809.
52. Ikomi F, Schmid-Schonbein GW. Lymph pump mechanics in the rabbit hind leg. *Am J Physiol*. 1996;271(1 Pt 2):H173-83.
53. Baluk P, Fuxe J, Hashizume H, Romano T, Lashnits E, Butz S, et al. Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J Exp Med*. 2007;204(10):2349-62.

54. Adamczyk LA, Gordon K, Kholová I, Meijer-Jorna LB, Telinius N, Gallagher PJ, et al. Lymph vessels: the forgotten second circulation in health and disease. *Virchows Archiv*. 2016;469(1):3-17.
55. Zawieja DC. Contractile Physiology of Lymphatics. *Lymphatic Research and Biology*. 2009;7(2):87-96.
56. Osada M, Inoue O, Ding G, Shirai T, Ichise H, Hirayama K, et al. Platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells. *J Biol Chem*. 2012;287(26):22241-52.
57. Hess PR, Rawnsley DR, Jakus Z, Yang Y, Sweet DT, Fu J, et al. Platelets mediate lymphovenous hemostasis to maintain blood-lymphatic separation throughout life. *J Clin Invest*. 2014;124(1):273-84.
58. Schulte-Merker S, Sabine A, Petrova TV. Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. *The Journal of Cell Biology*. 2011;193(4):607.
59. Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Grail D, et al. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol*. 2005;25(6):2441-9.
60. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nature Immunology*. 2004;5(1):74-80.
61. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, et al. Cardiovascular Failure in Mouse Embryos Deficient in VEGF Receptor-3. *Science*. 1998;282(5390):946.
62. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(8):3566.
63. Partanen TA, Arola J, Saaristo A, Jussila L, Ora ARI, Miettinen M, et al. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *The FASEB Journal*. 2000;14(13):2087-96.
64. Hamrah P, Chen L, Cursiefen C, Zhang Q, Joyce NC, Dana MR. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) on monocytic bone marrow-derived cells in the conjunctiva. *Exp Eye Res*. 2004;79(4):553-61.
65. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, et al. Angiosarcomas Express Mixed Endothelial Phenotypes of Blood and Lymphatic Capillaries: Podoplanin as a Specific Marker for Lymphatic Endothelium. *The American Journal of Pathology*. 1999;154(2):385-94.
66. Bianchi R, Russo E, Bachmann Samia B, Proulx Steven T, Sesartic M, Smaadahl N, et al. Postnatal Deletion of Podoplanin in Lymphatic Endothelium Results in Blood Filling of the Lymphatic System and Impairs Dendritic Cell Migration to Lymph Nodes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2017;37(1):108-17.
67. Astarita J, Acton S, Turley S. Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Frontiers in Immunology*. 2012;3(283).
68. Baluk P, McDonald DM. Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1131:1-12.

69. Schledzewski K, Falkowski M, Moldenhauer G, Metharom P, Kzhyshkowska J, Ganss R, et al. Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1+, F4/80+, CD11b+ macrophages in malignant tumours and wound healing tissue in vivo and in bone marrow cultures in vitro: implications for the assessment of lymphangiogenesis. *J Pathol.* 2006;209(1):67-77.
70. Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, et al. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol.* 1999;144(4):789-801.
71. Johnson LA, Banerji S, Lawrance W, Gileadi U, Prota G, Holder KA, et al. Dendritic cells enter lymph vessels by hyaluronan-mediated docking to the endothelial receptor LYVE-1. *Nature Immunology.* 2017;18:762.
72. Gale NW, Prevo R, Espinosa J, Ferguson DJ, Dominguez MG, Yancopoulos GD, et al. Normal Lymphatic Development and Function in Mice Deficient for the Lymphatic Hyaluronan Receptor LYVE-1. *Molecular and Cellular Biology.* 2007;27(2):595.
73. Rockson SG. Lymphedema. *Am J Med.* 2001;110(4):288-95.
74. Milasan A, Dallaire F, Mayer G, Martel C. Effects of LDL Receptor Modulation on Lymphatic Function. *Scientific Reports.* 2016;6:27862.
75. Milasan A, Smaani A, Martel C. Early rescue of lymphatic function limits atherosclerosis progression in *Ldlr*^{-/-} mice. *Atherosclerosis.* 2019;283:106-19.
76. Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem.* 1946;166(1):189-97.
77. Wolf P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *British Journal of Haematology.* 1967;13(3):269-88.
78. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles.* 2018;7(1):1535750.
79. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology.* 2013;200(4):373.
80. Milasan A, Tessandier N, Tan S, Brisson A, Boilard E, Martel C. Extracellular vesicles are present in mouse lymph and their level differs in atherosclerosis. *J Extracell Vesicles.* 2016;5:31427.
81. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:27066.
82. Andreu Z, Yanez-Mo M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol.* 2014;5:442.
83. Schmidt O, Teis D. The ESCRT machinery. *Curr Biol.* 2012;22(4):R116-20.
84. Baixauli F, López-Otín C, Mittelbrunn M. Exosomes and Autophagy: Coordinated Mechanisms for the Maintenance of Cellular Fitness. *Frontiers in Immunology.* 2014;5(403).
85. Spugnini EP, Logozzi M, Di Raimo R, Mizzoni D, Fais S. A Role of Tumor-Released Exosomes in Paracrine Dissemination and Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12).
86. Daleke DL. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res.* 2003;44(2):233-42.

87. Morel O, Jesel L, Freyssinet J-M, Toti F. Cellular Mechanisms Underlying the Formation of Circulating Microparticles. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011;31(1):15-26.
88. Connor DE, Exner T, Ma DDF, Joseph JE. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost*. 2010;103(05):1044-52.
89. Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, et al. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood*. 2009;113(5):1112-21.
90. Caruso S, Poon IKH. Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles: More Than Just Debris. *Front Immunol*. 2018;9:1486.
91. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.
92. Jiang L, Paone S, Caruso S, Atkin-Smith GK, Phan TK, Hulett MD, et al. Determining the contents and cell origins of apoptotic bodies by flow cytometry. *Scientific Reports*. 2017;7(1):14444.
93. Zirngibl M, F rnrohr BG, Janko C, Munoz LE, Voll RE, Gregory CD, et al. Loading of nuclear autoantigens prototypically recognized by systemic lupus erythematosus sera into late apoptotic vesicles requires intact microtubules and myosin light chain kinase activity. *Clinical & Experimental Immunology*. 2015;179(1):39-49.
94. Pollet H, Conrard L, Cloos AS, Tyteca D. Plasma Membrane Lipid Domains as Platforms for Vesicle Biogenesis and Shedding? *Biomolecules*. 2018;8(3).
95. Venturella M, Carpi FM, Zocco D. Standardization of Blood Collection and Processing for the Diagnostic Use of Extracellular Vesicles. *Current Pathobiology Reports*. 2019;7(1):1-8.
96. Witwer KW, Buz s EI, Bemis LT, Bora A, L sser C, L tvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2013;2(1):20360.
97. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Dignat-George F. Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(8):807-18.
98. McVey MJ, Spring CM, Kuebler WM. Improved resolution in extracellular vesicle populations using 405 instead of 488 nm side scatter. *Journal of extracellular vesicles*. 2018;7(1):1454776-.
99. van der Pol E, Sturk A, van Leeuwen T, Nieuwland R, Coumans F, group I-S-VW. Standardization of extracellular vesicle measurements by flow cytometry through vesicle diameter approximation. *J Thromb Haemost*. 2018;16(6):1236-45.
100. Boilard E, Duche  A-C, Brisson A. The diversity of platelet microparticles. *Curr Opin Hematol*. 2015;22(5):437-44.
101. van der Zee PM, Bir   , Ko Y, de Winter RJ, Hack CE, Sturk A, et al. P-Selectin- and CD63-Exposing Platelet Microparticles Reflect Platelet Activation in Peripheral Arterial Disease and Myocardial Infarction. *Clinical Chemistry*. 2006;52(4):657.
102. Shantsila E, Kamphuisen PW, Lip GYH. Circulating microparticles in cardiovascular disease: implications for atherogenesis and atherothrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010;8(11):2358-68.

103. Edrissi H, Schock SC, Hakim AM, Thompson CS. Microparticles generated during chronic cerebral ischemia increase the permeability of microvascular endothelial barriers in vitro. *Brain Research*. 2016;1634:83-93.
104. Böing AN, Hau CM, Sturk A, Nieuwland R. Platelet microparticles contain active caspase 3. *Platelets*. 2008;19(2):96-103.
105. Barry OP, Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(1):136-44.
106. Pakala R. Serotonin and thromboxane A2 stimulate platelet-derived microparticle-induced smooth muscle cell proliferation. *Cardiovascular Radiation Medicine*. 2004;5(1):20-6.
107. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Panteleev MA, Krymskaya OV, et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thrombosis and haemostasis*. 2007;97(3):425-34.
108. Van Der Meijden PEJ, Van Schilfgaarde M, Van Oerle R, Renné T, Ten Cate H, Spronk HMH. Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2012;10(7):1355-62.
109. Nomura S, Suzuki M, Katsura K, Xie GL, Miyazaki Y, Miyake T, et al. Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1995;116(2):235-40.
110. Willekens FLA, Werre JM, Groenen-Döpp YAM, Roerdinkholder-Stoelwinder B, de Pauw B, Bosman GJCGM. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *British journal of haematology*. 2008;141(4):549-56.
111. Shet AS. Characterizing blood microparticles: technical aspects and challenges. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(4):769-74.
112. Donadee C, Raat Nicolaas JH, Kanas T, Tejero J, Lee Janet S, Kelley Eric E, et al. Nitric Oxide Scavenging by Red Blood Cell Microparticles and Cell-Free Hemoglobin as a Mechanism for the Red Cell Storage Lesion. *Circulation*. 2011;124(4):465-76.
113. Levin G, Sukhareva E, Lavrentieva A. Impact of microparticles derived from erythrocytes on fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2016;41(3):452-8.
114. Helal O, Defoort C, Robert S, Marin C, Lesavre N, Lopez-Miranda J, et al. Increased levels of microparticles originating from endothelial cells, platelets and erythrocytes in subjects with metabolic syndrome: Relationship with oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2011;21(9):665-71.
115. Rubin O, Canellini G, Delobel J, Lion N, Tissot J-D. Red blood cell microparticles: clinical relevance. *Transfus Med Hemother*. 2012;39(5):342-7.
116. Dignat-George F, Boulanger Chantal M. The Many Faces of Endothelial Microparticles. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011;31(1):27-33.
117. Curtis AM, Edelberg J, Jonas R, Rogers WT, Moore JS, Syed W, et al. Endothelial microparticles: sophisticated vesicles modulating vascular function. *Vasc Med*. 2013;18(4):204-14.
118. Nozaki T, Sugiyama S, Koga H, Sugamura K, Ohba K, Matsuzawa Y, et al. Significance of a multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54(7):601-8.

119. Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V. Shedding of the Matrix Metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as Membrane Vesicle-Associated Components by Endothelial Cells. *The American Journal of Pathology*. 2002;160(2):673-80.
120. Boulanger CM, Loyer X, Rautou P-E, Amabile N. Extracellular vesicles in coronary artery disease. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(5):259-72.
121. Leroyer AS, Tedgui A, Boulanger CM. Role of microparticles in atherothrombosis. *Journal of Internal Medicine*. 2008;263(5):528-37.
122. Baka Z, Senolt L, Vencovsky J, Mann H, Simon PS, Kittel A, et al. Increased serum concentration of immune cell derived microparticles in polymyositis/dermatomyositis. *Immunol Lett*. 2010;128(2):124-30.
123. Angelillo-Scherrer A. Leukocyte-derived microparticles in vascular homeostasis. *Circulation research*. 2012;110(2):356-69.
124. Jean G. Rôle des vésicules extracellulaires dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium lymphatique. 2018, November.
125. Zawieja SD, Wang W, Wu X, Nepiyushchikh ZV, Zawieja DC, Muthuchamy M. Impairments in the intrinsic contractility of mesenteric collecting lymphatics in a rat model of metabolic syndrome. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2011;302(3):H643-H53.
126. Martínez MC, Andriantsitohaina R. Extracellular Vesicles in Metabolic Syndrome. *Circulation Research*. 2017;120(10):1674-86.
127. Bonte CA, Ceuppens J, Leys AM. Hypotensive shock as a complication of infracyanine green injection. *Retina*. 1998;18(5):476-7.
128. Chu W, Chennamsetty A, Toroussian R, Lau C. Anaphylactic Shock After Intravenous Administration of Indocyanine Green During Robotic Partial Nephrectomy. *Urol Case Rep*. 2017;12:37-8.
129. Van Der Pol E, Van Gemert MJC, Sturk A, Nieuwland R, Van Leeuwen TG. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2012;10(5):919-30.
130. Aass HCD, Øvstebø R, Trøseid A-MS, Kierulf P, Berg JP, Henriksson CE. Fluorescent particles in the antibody solution result in false TF- and CD14-positive microparticles in flow cytometric analysis. *Cytometry A*. 2011;79(12):990-9.
131. Alkhatatbeh MJ, Enjeti AK, Baqar S, Ekinci EI, Liu D, Thorne RF, et al. Strategies for enumeration of circulating microvesicles on a conventional flow cytometer: Counting beads and scatter parameters. *J Circ Biomark*. 2018;7:1849454418766966-.
132. Lyons AB. Divided we stand: tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol Cell Biol*. 1999;77(6):509-15.
133. Inglis HC, Danesh A, Shah A, Lacroix J, Spinella PC, Norris PJ. Techniques to improve detection and analysis of extracellular vesicles using flow cytometry. *Cytometry A*. 2015;87(11):1052-63.
134. Morales-Kastresana A, Telford B, Musich TA, McKinnon K, Clayborne C, Braig Z, et al. Labeling Extracellular Vesicles for Nanoscale Flow Cytometry. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1878.
135. de Rond L, van der Pol E, Hau CM, Varga Z, Sturk A, van Leeuwen TG, et al. Comparison of Generic Fluorescent Markers for Detection of Extracellular Vesicles by Flow Cytometry. *Clinical Chemistry*. 2018;64(4):680.

136. Kim H, Kataru RP, Koh GY. Inflammation-associated lymphangiogenesis: a double-edged sword? *The Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(3):936-42.
137. Thane KE, Davis AM, Hoffman AM. Improved methods for fluorescent labeling and detection of single extracellular vesicles using nanoparticle tracking analysis. *Scientific Reports*. 2019;9(1):12295.
138. Unno N, Tanaka H, Suzuki M, Yamamoto N, Mano Y, Sano M, et al. Influence of age and gender on human lymphatic pumping pressure in the leg. *Lymphology*. 2011;44(3):113-20.
139. Eitan E, Green J, Bodogai M, Mode NA, Bæk R, Jørgensen MM, et al. Age-Related Changes in Plasma Extracellular Vesicle Characteristics and Internalization by Leukocytes. *Scientific reports*. 2017;7(1):1342-.
140. Angeli V, Llodrá J, Rong JX, Satoh K, Ishii S, Shimizu T, et al. Dyslipidemia Associated with Atherosclerotic Disease Systemically Alters Dendritic Cell Mobilization. *Immunity*. 2004;21(4):561-74.
141. Arngrim N, Simonsen L, Holst JJ, Bülow J. Reduced adipose tissue lymphatic drainage of macromolecules in obese subjects: a possible link between obesity and local tissue inflammation? *International Journal of Obesity*. 2013;37(5):748-50.
142. Erdbrügger U, Le TH. Extracellular vesicles as a novel diagnostic and research tool for patients with HTN and kidney disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2019;317(3):F641-F7.
143. Jansen F, Nickenig G, Werner N. Extracellular Vesicles in Cardiovascular Disease. *Circulation Research*. 2017;120(10):1649-57.
144. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, Drees EEE, El-Andaloussi S, et al. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circulation research*. 2017;120(10):1632-48.
145. Arraud N, Gounou C, Turpin D, Brisson AR. Fluorescence triggering: A general strategy for enumerating and phenotyping extracellular vesicles by flow cytometry. *Cytometry Part A*. 2016;89(2):184-95.
146. Shah MD, Bergeron AL, Dong J-F, López JA. Flow cytometric measurement of microparticles: Pitfalls and protocol modifications. *Platelets*. 2008;19(5):365-72.
147. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJP, Hole P, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2011;7(6):780-8.
148. Boekholdt SM, Peters Ron JG, Hack CE, Day Nicholas E, Luben R, Bingham Sheila A, et al. IL-8 Plasma Concentrations and the Risk of Future Coronary Artery Disease in Apparently Healthy Men and Women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004;24(8):1503-8.
149. Friedman GD, Klatsky AL, Siegel AB. The leukocyte count as a predictor of myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 1974;290(23):1275-8.
150. Urbanski K, Ludew D, Filip G, Filip M, Sagan A, Szczepaniak P, et al. CD14(+)CD16(++) "nonclassical" monocytes are associated with endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Thrombosis and haemostasis*. 2017;117(5):971-80.
151. Berg KE, Ljungcrantz I, Andersson L, Bryngelsson C, Hedblad B, Fredrikson GN, et al. Elevated CD14++CD16- monocytes predict cardiovascular events. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5(1):122-31.

152. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, et al. CD14++CD16+ Monocytes Independently Predict Cardiovascular Events. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(16):1512.
153. Hilgendorf I, Swirski FK. Making a difference: monocyte heterogeneity in cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2012;14(5):450-9.
154. Milasan A, Jean G, Dallaire F, Tardif JC, Merhi Y, Sorci - Thomas M, et al. Apolipoprotein A - I Modulates Atherosclerosis Through Lymphatic Vessel - Dependent Mechanisms in Mice. *Journal of the American Heart Association*. 6(9):e006892.
155. Smith JB, McIntosh GH, Morris B. The traffic of cells through tissues: a study of peripheral lymph in sheep. *J Anat*. 1970;107(Pt 1):87-100.
156. Hall JG, Morris B. THE ORIGIN OF THE CELLS IN THE EFFERENT LYMPH FROM A SINGLE LYMPH NODE. *The Journal of experimental medicine*. 1965;121(6):901-10.
157. Angeli V, Ginhoux F, Llodrà J, Quemeneur L, Frenette PS, Skobe M, et al. B cell-driven lymphangiogenesis in inflamed lymph nodes enhances dendritic cell mobilization. *Immunity*. 2006;24(2):203-15.
158. Kataru RP, Kim H, Jang C, Choi DK, Koh BI, Kim M, et al. T lymphocytes negatively regulate lymph node lymphatic vessel formation. *Immunity*. 2011;34(1):96-107.
159. Scallan JP, Zawieja SD, Castorena-Gonzalez JA, Davis MJ. Lymphatic pumping: mechanics, mechanisms and malfunction. *The Journal of physiology*. 2016;594(20):5749-68.
160. Mukherjee A, Hooks J, Nepiyushchikh Z, Dixon JB. Entrainment of Lymphatic Contraction to Oscillatory Flow. *Scientific Reports*. 2019;9(1):5840.
161. Matsumoto A, Takahashi Y, Chang H-Y, Wu Y-W, Yamamoto A, Ishihama Y, et al. Blood concentrations of small extracellular vesicles are determined by a balance between abundant secretion and rapid clearance. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2020;9(1):1696517.
162. Clayton A, Harris CL, Court J, Mason MD, Morgan BP. Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. *Eur J Immunol*. 2003;33(2):522-31.
163. Selahi A, Muthuchamy M, Jain A. Abstract 274: 3d Cylindrical Lymphangion-on-a-chip: a New Method to Model Lymphatic Inflammatory & Therapeutic Responses. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2019;39(Suppl_1):A274-A.
164. Zolla V, Nizamutdinova IT, Scharf B, Clement CC, Maejima D, Akl T, et al. Aging-related anatomical and biochemical changes in lymphatic collectors impair lymph transport, fluid homeostasis, and pathogen clearance. *Aging Cell*. 2015;14(4):582-94.
165. Colhoun HM, Otvos JD, Rubens MB, Taskinen MR, Underwood SR, Fuller JH. Lipoprotein Subclasses and Particle Sizes and Their Relationship With Coronary Artery Calcification in Men and Women With and Without Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2002;51(6):1949.
166. Wünnemann F, Sin Lo K, Langford-Avelar A, Busseuil D, Dubé M-P, Tardif J-C, et al. Validation of Genome-Wide Polygenic Risk Scores for Coronary Artery Disease in French Canadians. *Circ Genom Precis Med*. 2019;12(6):e002481-e.

